

Evolution von Zwei-Komponenten-Systemen in *Shewanella oneidensis* MR-1

**Die Histidinkinase ArcS und der Antwortregulator SO_4444,
Zwei Komponenten, Zwei Modelle.**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Jürgen Lassak
aus Erfurt

Marburg an der Lahn, 2010

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von September 2007 bis Oktober 2010 am Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie unter der Leitung von Dr. Kai M. Thormann durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (HKZ: 1180) als Dissertation angenommen am :

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Buckel

Zweitgutachter: Dr. Kai M. Thormann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2010

Ich versichere, dass ich meine Dissertation:

**„Evolution von Zwei-Komponenten-Systemen in *Shewanella oneidensis* MR-1:
Die Histidinkinase ArcS und der Antwortregulator SO_4444,
Zwei Komponenten, Zwei Modelle.“**

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 25.10.2010

Jürgen Lassak

Die während der Promotion erzielten Ergebnisse sind zum Teil in folgenden Originalpublikationen veröffentlicht:

1. ArcS, the cognate sensor kinase in an atypical Arc system of *Shewanella oneidensis* MR-1

Lassak J, Henche AL, Binnenkade L & Thormann KM.

Appl. Environ. Microbiol. 2010 May;76(10):3263-74.

2. Kinase/Phosphatase switch of ArcS in *Shewanella oneidensis* MR-1 is mediated by an interplay of an regulatory Receiver- and both PAS-domains

Lassak J & Thormann KM.

(In Vorbereitung)

Ergebnisse aus in dieser Dissertation nicht erwähnten Projekten sind in folgenden Originalpublikationen veröffentlicht:

3. Two different stator systems drive a single polar flagellum in *Shewanella oneidensis* MR-1

Paulick A, Koerdt A, Lassak J, Huntley S, Wilms I, Narberhaus F & Thormann KM.

Mol. Microbiol. 2009 Feb;71(4):836-50

4. Cervimycin C resistance in *Bacillus subtilis* is due to a promoter up mutation and increased mRNA stability of the constitutive ABC-transporter gene *bmrA*

Kruegel H, Licht A, Biedermann G, Petzold A, Lassak J, Hupfer Y, Schlott B, Hertweck C, Platzer M, Brantl S & Saluz H-P

FEMS Microbiol Lett 2010 (im Druck)

5. Characterization of the BarA/UvrY – Two-Component System of *Shewanella oneidensis* MR-1

Binnenkade L*, Lassak J*, Bubendorfer SP & Thormann KM

(in Vorbereitung)

6. Phage induced lysis enhances biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1

Gödeke J, Paul K, Lassak J, & Thormann KM

ISME J. 2010 (im Druck)

* Diese Autoren wirken gleichberechtigt an der Publikation mit

*„Wissenschaft hat etwas Faszinierendes an sich.
So eine geringfügige Investition an Fakten liefert so einen reichen Ertrag an Voraussagen.“*

Mark Twain

1	Inhalt	
1	Inhalt	13
2	Abstract	15
3	Zusammenfassung	16
4	Einleitung	18
4.1	Genus <i>Shewanella</i>	18
4.1.1	Allgemeines	19
4.1.2	Metabolismus	20
4.1.3	Regulation	23
4.2	Zwei-Komponenten-Signaltransduktion	25
4.2.1	Phosphogruppentransferchemie	26
4.2.2	Architektur	27
4.2.3	Verteilung und Verbreitung	31
4.2.4	Evolution	32
4.3	Anoxische Redoxkontrolle – Das Arc-Zwei-Komponenten-System	35
4.3.1	Arc-Regulon in <i>E. coli</i>	37
4.3.2	Antwortregulator ArcA in <i>E. coli</i>	38
4.3.3	Sensorkinase ArcB in <i>E. coli</i>	38
4.3.4	Arc-System von <i>Shewanella</i>	41
5	Ergebnisse	42
5.1	Arc-System von <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	42
5.1.1	SO_0577 – Eine mögliche Sensorkinase zu ArcA	42
5.1.2	Bioinformatische Charakterisierung von SO_0577	43
5.1.3	Offener Leserahmen von <i>arcS</i>	44
5.1.4	Phänotypische Analyse von <i>S. oneidensis</i> MR-1 <i>arc</i> -Deletionsmutanten	46
5.1.5	Interaktionsstudien mit ArcS, HptA, und ArcA	63
5.1.6	Phänotypische Untersuchungen am ArcS Ortholog Sput_CN32_3300	67
5.1.7	Komplementationsanalysen an <i>S. oneidensis</i> MR-1 Δ <i>arcS</i> mit <i>E. coli</i> ArcB	68
5.1.8	Phylogenetische Untersuchungen an ArcS	69
5.1.9	<i>In vitro</i> Interaktionsuntersuchungen mit ArcS Mutanten	71
5.1.10	<i>In vivo</i> Analyse von <i>S. oneidensis</i> MR-1 mit Mutationen in ArcS und ArcA	72
5.1.11	Regulation des Arc-Systems in <i>S. oneidensis</i> MR-1	80
5.2	Antwortregulator SO_4444	81
5.2.1	Phylogenetische Charakterisierung von SO_4444	82
5.2.2	Phänotypische Analyse von <i>S. oneidensis</i> MR-1 von Δ SO_4444	83
5.2.3	Transkriptomanalysen an der Deletionsmutante Δ SO_4444	84
6	Abschlussbemerkung	87
7	Diskussion	88

7.1	Antwortregulator SO_4444	88
7.1.1	RcsB ein mögliches Homolog zu SO_4444?	88
7.1.2	SO_4444 und SO_4445 Komponenten in einem TCS-System ?	89
7.1.3	SO_4444 und Plasmidsegregation	90
7.1.4	Stammbäume und horizontaler Gentransfer	91
7.2	<i>S. oneidensis</i> MR-1 Arc-System	93
7.2.1	ArcS, HptA und ArcA rekonstituieren ein atypisches Arc-System	93
7.2.2	Sensorische und mechanistische Konvergenz – ArcA, HptA und SixA	93
7.2.3	Mechanistische Diversität – Die zwei ArcS-Empfängerdomänen	94
7.2.4	Rolle des katalytischen ArcS-HK _{H731}	96
7.2.5	Rolle der sensorischen PAS-Domänen	98
7.2.6	Rolle der sensorischen CaChe-Domäne	99
7.2.7	Physiologischer Stimulus für ArcS	100
7.2.8	Phylogenetischer Ursprung von ArcS	102
8	Material und Methoden	104
8.1	Material	104
8.1.1	Geräte	104
8.1.2	Chemikalien	104
8.1.3	Enzyme	104
8.1.4	Kits	105
8.1.5	Antibiotika	105
8.1.6	Puffer	Fehler! Textmarke nicht definiert.
8.1.7	Medien	Fehler! Textmarke nicht definiert.
8.1.8	Oligonukleotide	108
8.1.9	Plasmide und Stämme	113
8.2	Methoden	117
8.2.1	Bakterielle Stämme und Wachstumsbedingungen	117
8.2.2	Konstruktion rekombinanter Bakterienstämme	117
8.2.3	Erstellung von Expressionsprofilen	118
8.2.4	Quantitative Realtime-PCR	120
8.2.5	Überproduktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine	120
8.2.6	<i>in vitro</i> Autophosphorylierungs- und Phosphogruppentransferstudien	121
8.2.7	Westen-Blot Analysen	121
8.2.8	Biofilmbildung	122
8.2.9	Motilität	122
9	Quellen	123
10	Danksagung	135

2 Abstract

Most prokaryotic signal transduction systems and a few eukaryotic pathways use phosphotransfer schemes involving two conserved components, a histidine protein kinase and a response regulator protein. The histidine protein kinase, which is regulated by environmental stimuli, autophosphorylates at a histidine residue, creating a high-energy phosphoryl group that is subsequently transferred to an aspartate residue in the response regulator protein. Phosphorylation induces a conformational change in the regulatory domain that results in activation of an associated domain that elicits the response.

Related species usually rely upon orthologous regulatory systems to orchestrate responses to a given signal. Under certain circumstances, the elicited responses are largely similar across species, indicative that orthologous regulatory systems control common cellular functions across species even if the species occupy different niches. In other circumstances, the responses are distinct, either in qualitative or quantitative terms, suggesting that the regulatory systems adopted by individual species are suited to particular habitats and lifestyles.

The availability of oxygen is a major environmental factor for many microbes, in particular for bacteria such as *Shewanella* species, which thrive in redox-stratified environments. One of the best-studied systems involved in mediating the response to changes in environmental oxygen levels is the Arc two-component system of *Escherichia coli*, consisting of the sensor kinase ArcB and the cognate response regulator ArcA. An ArcA ortholog was previously identified in *Shewanella*, and as in *Escherichia coli*, *Shewanella* ArcA is involved in regulating the response to shifts in oxygen levels. Here, we identified the hybrid sensor kinase SO_0577, now designated ArcS, as the previously elusive cognate sensor kinase of the Arc system in *Shewanella oneidensis* MR-1. Phenotypic mutant characterization, transcriptomic analysis, protein-protein interaction, and phosphotransfer studies revealed that the *Shewanella* Arc system consists of the sensor kinase ArcS, the single phosphotransfer domain protein HptA, and the response regulator ArcA. Phylogenetic analyses suggest that HptA might be a relict of ArcB. Conversely, ArcS is substantially different with respect to overall sequence homologies and domain organizations. Thus, we speculate that ArcS might have adopted the role of ArcB after a loss of the original sensor kinase, perhaps as a consequence of regulatory adaptation to a redox-stratified environment.

In contrast to the highly conserved histidine kinase ArcS, the response regulator SO_4444 is species-specific for *S. oneidensis* MR-1 and *S. baltica* OS223. Bioinformatic analyses of SO_4444 and its genetic context suggest horizontal gene transfer from *Aeromonas* species. Moreover, phenotypic mutant characterization and transcriptomic analysis revealed incorporation of the phylogenetic new component SO_4444 into the consisting regulatory network of *S. oneidensis* MR-1.

Thus, the response regulator SO_4444 as well as the *Shewanella* Arc-System exemplify two evolutionary strategies changing two-component regulatory networks in bacteria.

3 Zusammenfassung

Die Eroberung neuer Lebensräume und die Anpassung an verschiedenste Umweltbedingungen können durch Organismen ein und derselben Familie erfolgen. Die entstehende Artenvielfalt resultiert primär nicht auf Grund von Veränderungen im genetischen Bauplan sondern vielmehr aus der Diversifikation der regulatorischen Signaltransduktionssysteme welche diesen Bauplan umsetzen.

Unter diesen Systemen ist die Zwei-Komponenten-Signaltransduktion (TCS) von zentraler Bedeutung für die koordinierte Antwort auf umweltbedingte Veränderungen nicht nur in Bakterien sondern auch in Archaeen, Protisten und Pilzen. Prototypischerweise reagiert eine Rezeptorhistidinkinase auf ein extrazelluläres Signal und leitet dieses durch Transphosphorylierung auf einen zytoplasmatischen Antwortregulator weiter, welcher seinerseits als Transkriptionsfaktor agiert. Dabei können orthologe Transkriptionsfaktoren für die Expression völlig unterschiedlicher Gene verantwortlich sein und es eröffnen sich Spielräume für die Anpassung an unterschiedlichste Umweltbedingungen.

Shewanella Spezies sind Gram-negative, fakultativ anaerobe Alteromonaden. Die 48 bisher bekannten Arten haben nicht nur marine und limnische Habitate erobert, sondern man findet sie auch als Symbionten und Pathogene vor allem von Fischen. Die Besiedlung so unterschiedlicher ökologischer Nischen schlägt sich auch in der Diversität der Regulationssysteme nieder. So variieren allein die bekannten Zahlen von TCS-Proteinen innerhalb der *Shewanellaceae* von 67 in *S. denitrificans* OS217 bis 116 in *S. sediminis* HAW-EB3.

Der Antwortregulator SO_4444 gehört dabei zu den TCS-Proteinen, die sich ausschließlich in einigen wenigen Shewanellen finden (*S. baltica* OS223 und *S. oneidensis* MR-1). Phylogenetische Untersuchungen des genetischen Kontextes von SO_4444 legen den Schluss nahe, dass der Antwortregulator zusammen mit einer Hybrid-Histidinkinase SO_4445 und weiteren fünf Genen durch lateralen Gentransfer aus *Aeromonas* sp. akquiriert wurde. Deletionen und Insertionen in SO_4444 führen, verglichen mit dem Wildtyp, zu einer Beeinträchtigung der Biofilmbildung sowohl unter statischen Bedingungen als auch in einem hydrodynamischen Flusskammersystem. Eine Erhöhung des intrazellulären Levels an an zyklischem Guanosinmonophosphat (c-di-GMP) durch das Einbringen einer Guanylatzyklase aus *Vibrio cholerae* (VCA_0956) und die resultierende partielle Wiederherstellung des Wildtypphänotyps deuten auf eine Abhängigkeit des Δ SO_4444-Biofilmphänotyps von dem Signalmolekül. Darüber hinaus zeigen weitere Untersuchungen im genetischen Kontext von SO_4444 ebenso für die Hybrid-Histidinkinase SO_4445 einen deutlichen Einfluss auf den Biofilm. Interessanterweise unterscheidet sich dieser sowohl in Quantität und Morphologie. Zudem führt die Deletion beider Gene zu einem der Einzeldelation Δ SO_4445 vergleichbaren Phänotyp. Damit lassen sowohl die differentiellen Phänotypen in Δ SO_4444 und Δ SO_4445, als auch das Verhalten des Doppel-Delentionsstamms keine offensichtlichen Schlüsse zu, ob oder wie die beiden Komponenten zusammenarbeiten. Jedoch zeigen unsere Untersuchungen deutlich, dass horizontaler Gentransfer von TCS-Elementen Einfluss auf ein bestehendes regulatorisches Netzwerk ausüben kann, und sich damit

sowohl die Möglichkeit bietet das sensorische Potential eines Organismus zu erweitern als auch bestehende Regulationsmechanismen zu verfeinern oder neue zu etablieren.

Im Gegensatz zu SO_4444 ist die Hybridsensorkinase ArcS (SO_0577) eine Autapomorphie aller Shewanellen und damit Bestandteil des Kernsatzes an TCS-Proteinen. Unsere Untersuchungen in *S. oneidensis* MR-1 konnten das Protein als korrespondierende Kinase zum Antwortregulator ArcA identifizieren. Die Anoxische Redoxkontrolle (Arc) regelt in *Escherichia coli* u.a. die Anpassung an einen wechselnden Sauerstoffgehalt in der Umwelt. Hierbei misst die Sensorkinase ArcB den Redox-Status des Chinon-Pools der Membran und leitet die Information über ein Phosphorelaisystem an ArcA weiter. Identifiziert man ein Pendant zum *E. coli* ArcA in *Shewanella* leicht durch eindeutige Sequenzähnlichkeiten (81% Sequenzidentität für *S. oneidensis*), so führt ein Abgleich von ArcB (*E. coli*) mit dem *Shewanella* Proteom zu keinem eindeutigen Ergebnis. Nur das Histidin-Phosphotransfer-Protein HptA zeigt signifikante Homologien zum C-Terminus von ArcB. Interessanterweise liegt *hptA* im gleichen genetischen Kontext wie das *E. coli* *arcB*. Diese Tatsache spricht entweder für Deletion oder Translokation des die Kinase kodierenden Genabschnitts. Phänotypische Vergleiche der Deletionstämme $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$ mit *S. oneidensis* Wildtyp offenbaren auffällige Übereinstimmungen der Mutanten bezogen auf Wachstum, Biofilmbildung und. Dabei zeigten zugehörige Doppel- und Tripple-Deletionen nie kumulative Effekte. Mehr noch *in vitro* Interaktionsstudien an aufgereinigten Proteinen zeigen Phosphotransfer zwischen ArcS, HptA und ArcA. Damit rekonstituiert sich das atypische Arc-der *Shewanellaceae* aus ArcS, HptA und ArcA.

ArcS weicht in seiner modularen Struktur stark von der bekannter ArcB-Proteine ab und weist auch keinerlei signifikante Sequenzhomologien zu ArcB auf. Damit bildet ArcS einen phylogenetisch distinkten Arm von „ArcB“-Proteinen. Doch dieser auffälligen strukturellen und phylogenetischen Unterschiede zum Trotz ist es möglich, Deletionen in *arcB* (*E. coli*) und *arcS* und/oder *hptA* (*S. oneidensis* MR-1) zu kreuzkomplementieren. Zusammengefasst stützt dies die These einer Trunkierung der sensorischen Komponente ArcB und Rekrutierung der alternativen Sensorkinase ArcS als funktionalen Ersatz.

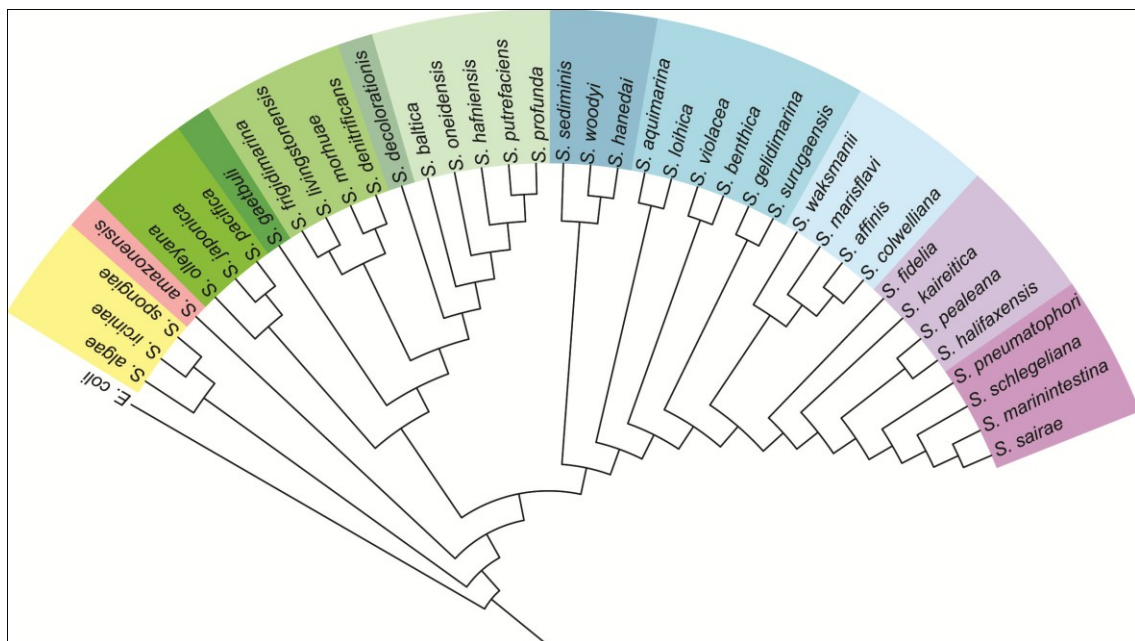
Weiterführende *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen an den katalytischen Resten ArcS-HK_{H731}, ArcS-RecI_{D1017} und ArcS-RecII_{D1162} deuten aber darauf hin, dass obwohl ArcS und ArcB funktional konvergieren, der Regulationsmechanismus fundamental unterscheidet. Vergleichende Analysen zwischen ArcB (*E. coli*)- und ArcS-Sensorik indizieren zudem eine Veränderung im Signalspektrum ebenso wie in der Signalaufnahme und Signalweiterleitung.

Das *Shewanella* Arc-System steht damit ebenso beispielhaft wie der Antwortregulator SO_4444 für den evolutionären Wandel von TCS-Schaltkreisen, der es diesen Bakterien mit ermöglicht in verschiedenste Lebensräume vorzudringen und sich dort erfolgreich zu behaupten.

4 Einleitung

4.1 Genus *Shewanella*

Bei der Identifizierung von Mikroorganismen in ranziger Butter wurde im Jahre 1931 *Shewanella* erstmals als *Achromobacter putrefaciens* (48) isoliert. Nach Umbenennung des Taxons in *Pseudomonas* im Jahre 1941 (133) und weiteren Reklassifizierungen in den 60er und 70er Jahren unter anderem in *Alteromonas* (11), schlug 1985 die Geburtsstunde von *Shewanella* als eigene Gattung innerhalb der Ordnung Alteromonadales (138). Bis heute sind 48 eigenständige Arten mit 17 vollständig sequenzierten Genomen (Abb.1; Tabelle 1) aus unterschiedlichsten Lebensräumen bekannt (80).



nach Hau *et al.* 2006 (80)

Abb.1: Phylogenetische Analyse des Genus *Shewanella* aus (80)

Phylogenetische Vergleiche innerhalb des Genus *Shewanella* zeigen für einige Gruppen einen Zusammenhang zwischen Habitat und genetischem Ursprung. Verschiedene Farben stehen stellvertretend für die unterschiedlichen phylogenetischen Gruppen (vgl. Tabelle 1). In einigen Fällen korrelieren diese Gruppen mit dem entsprechenden Habitat. So bilden z.B. Isolate aus dem Darmtrakt von Fischen (violett) eine monophyletische Gruppe.

Die der Analyse zugrunde liegenden 16 S rRNA-Sequenzen wurden auf ~1200bp getrimmt um die Einbindung auch solcher Isolate mit unvollständiger 16 S rRNA zu ermöglichen. Der bioinformatische Abgleich erfolgte mit ClustalW. Der phylogenetische Baum wurde beruhend auf dem Neighbor-Joining Algorithmus nach 1000 bootstraps mit PAUP berechnet. Als Outgroup diente *Escherichia coli* MG1655 Die Visualisierung erfolgte online (<http://itol.embl.de/>) mit dem Interactive Tree of Life (127).

4.1.1 Allgemeines

Die physiologisch und ökologisch sehr heterogene Gruppe der Shewanellen umfasst nicht nur freilebende Vertreter, deren Umwelt sich in Bezug auf Nährstoffe, Salzgehalt, Temperatur, Redoxpotential, und Druck unterscheidet, sondern es existieren auch Arten, die mit anderen Organismen in Symbiose, Epibiose und Synthrophie koexistieren oder sogar als deren Pathogene auftreten (80) (Tabelle 1).

Allgemein formen die fakultativ anaeroben γ -Proteobakterien der Gattung *Shewanella* gram-negative Stäbchen mit einer Länge von 2-3 μm und einem Durchmesser von 0,4-0,7 μm (229). Sie sind motil – meist durch ein einzelnes polares Flagellum (229) – und lassen sich nach Anreicherung leicht kultivieren und genetisch manipulieren. Damit unterscheidet sich *Shewanella* kaum von dem Modellorganismus für gram-negative Bakterien *E. coli*.

Es erklärt auch recht einfach, warum die moderne Ära *Shewanella* erst 1988 mit der Beschreibung der Dissimilation von Mangan- und Eisenoxide durch *S. oneidensis* MR-1 begann (158). Die Fähigkeit, mehr als 10 verschiedene terminale Elektronenakzeptoren unter anaeroben Bedingungen zu nutzen (107) – darunter nicht nur feste Metalloxide – offenbart hier eine erstaunliche Bandbreite, verglichen mit anderen Bakterien wie *E. coli*. So ist *S. oneidensis* MR-1 in der Lage Sulfide aus Thiosulfaten zu gewinnen und kann darüber hinaus elementaren Schwefel reduzieren. Besonders letzteres ist für fakultative Anaerobier eher ungewöhnlich (80).

Es dauerte nicht lange und es stellte sich heraus, dass auch seltene Metallionen wie Uranat [U(VI)] (30) Chromat [Cr(VI)] (236), Iodat (57), Technetium (237), Neptunium (132), Plutonium (24), Selenit (112), Tellurit (112) und Vanadat (33) durch *Shewanella* Spezies reduziert werden können. Mit diesem metabolischen Potential könnten durch den biotechnologischen Einsatz von *Shewanella* Spezies z.B. Radionukleotidverseuchte Gebiete dekontaminiert werden. Die Verstoffwechselung von Umweltgiften wie Nitroarenen durch einige Arten (249) bietet zudem die Möglichkeit der Detoxifikation vergifteter Areale.

Im Verständnis des zugrunde liegenden Metabolismus und den assoziierten Regulationsmechanismen liegt der Schlüssel zur Nutzbarmachung von *Shewanella* zu Zwecken der Remediation.

Tabelle 1: *Shewanella* Spezies mit sequenzierten Genomen (63)

Spezies oder Stamm	Geografischer Ursprung	Habitat, Charakteristika	Quelle
<i>S. amazonensis</i> SB2B	Amapa Fluss, Brasilien	Sediment; suboxisches Redoxbedingungen; Tiefe: 1 m	(227)
<i>S. baltica</i> OS155	Ostsee	Meerwasser; oxische Zone O ₂ 2ml/l; Tiefe: 90 m	(27)
<i>S. baltica</i> OS185	Ostsee	Meerwasser; oxisch-anaoxische Grenzschrift; Tiefe: 120 m	(27)
<i>S. baltica</i> OS195	Ostsee	Meerwasser; anoxische Zone; Tiefe: 140 m	(27)
<i>S. baltica</i> OS223	Ostsee	Meerwasser; oxisch-anaoxische Grenzschrift; Tiefe: 120 m	(27)
<i>S. benthica</i> KT99	Tonga-Kermadec Graben	Tiefsee; Hochdruckzone; Tiefe: 9000 m	(46)
<i>S. frigidimarina</i>	Nordsee, Aberdeen, UK	Meerwasser	(25)
<i>S. halifaxensis</i> HAW-EB4	Hafen von Halifax , Neu-Schottland, CA	Sediment, Schwerindustriehalde, Tiefe: 215 m	(250)
<i>S. livingstonensis</i> Ac10	Antarktische Küste	Meerwasser	(116)
<i>S. loihica</i> PV-4	Hawaii Emperor-Rücken	Hydrothermaler Schlot, eisenhaltige Schlämme, Tiefe: 1325 m	(66)
<i>S. oneidensis</i> MR-1	Lake Oneida, USA	Limnisches Sediment, anoxische Zone, Mn(IV)-Reduktion	(229)
<i>S. pealeana</i> ANG-SQ1	Wood Hole Harbor, USA	Tintenfisch, Nidamentaldrüse	(126)
<i>S. piezotolerans</i> WP3	Westpazifik (142°Ost, 8°Nord)	Sediment, Tiefe: 1914 m	(232)
<i>S. putrefaciens</i> CN-32	Albuquerque, USA	Schiefersandstein, Tiefe: 250 m	(64)
<i>S. putrefaciens</i> 200	Alberta, CA	Rohöl-Rohrleitung	(166)
<i>S. sediminis</i> HAW-EB3	Hafen von Halifax , Neu-Schottland, CA	Sediment, 50 nautische Meilen vor der Küste, Tiefe: 215 m	(249)
<i>S. sp. ANA-3</i>	Wood Hole Harbor, USA	Brackwasser, Arsenbehandelter Holzpieper	(199)
<i>S. sp. MR-4</i>	Schwarzes Meer	Meerwasser; oxische Zone, 16°C, Tiefe: 5 m	(163)
<i>S. sp. MR-7</i>	Schwarzes Meer	Meerwasser; anoxische Zone; Hoher Nitratgehalt, Tiefe: 60 m	(163)
<i>S. sp. W3-18-1</i>	Washington coast, Pazifik	Sediment, unterhalb oxischen Meerwassers, Tiefe: 1000m	(153)
<i>S. violaceae</i> DSS12	Ryuku Graben, Phillipinische See	Sediment, Tiefe: 5110 m	(165)
<i>S. woodyi</i> MS32	Straße von Gibraltar, Mittelmeer	Detritus, Tiefe: 370 m	(140)

4.1.2 Metabolismus

Überleben in einer Umgebung, die durch Redox- und Nährstoffgradienten geprägt ist, erfordert eine hohe Flexibilität sowohl der energieerzeugenden Netzwerke als auch der Biosynthesewege. Das beinhaltet zum einen den Kohlenstoffmetabolismus und zum anderen den Elektronentransport.

Elektronentransport

Im Genom von *S. oneidensis* MR-1 findet man eine Vielzahl möglicher Elektronentransportsysteme darunter 42 putative Typ C-Cytochrome (149). Aus früheren Studien ist bekannt, dass die respiratorische Vielfalt von *S. oneidensis* MR-1 von Cytochrom C abhängig ist. So führen Mutationen in den Reifungsgenen für Cytochrom C *ccmB* (43) und *ccmC* (23) zu einem totalen Verlust der anaeroben Respiration. Als Shuttleproteine im Elektronentransfer auf Fe(III) - Mn(IV) - Oxide und Dimethylsulfoxid (DMSO) zeichnen sich das Tetrahämcytochrom C CymA in der inneren Membran, MtrA und DmsE im Periplasma, sowie MtrB oder DmsF und die Decahämcytochrome MtrC und OmcA in der äußeren Membran verantwortlich (14, 15, 154, 159, 160). Von den verbleibenden Cytochromen kann nur einer kleinen Zahl – über bekannte orthologe Proteine – eine Funktion zugewiesen werden. Damit ist bekannt, welche Cytochrome an der Veratmung von Fumarat (155, 156) Nitrat (41), DMSO (76) und Trimethylamin-N-oxid (TMAO) (76) beteiligt sind. Über die weitaus größere Zahl Cytochrome ist nur bekannt, dass deren Expression durch Thiosulfat und Nitrat stimuliert wird (63).

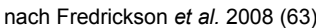
Kohlenstoffmetabolismus

S. oneidensis MR-1 kodiert eine Vielzahl von Stoffwechselwegen darunter den Katabolismus von organischen Säuren (C1-3), Fettsäuren, Aminosäuren, Peptiden und Nukleotiden (204). Darin spiegelt sich die biologische Bedeutung von *S. oneidensis* MR-1 als Verwerter organischer Abbauprodukte.

Der Grundbaustein des Chitin – N-Acetylglukosamin (NAG) – ist eine der bevorzugten Kohlenstoff- und Stickstoffquellen für *S. oneidensis* MR-1 und wird über einen neuartigen Stoffwechselweg durch die Proteine NagBII und NagK in die Glykolyse eingeschleust (245) (Abb. 2).

Die Verwertung von Milchsäure als primäre Kohlenstoff- und Energiequelle stellt eines der metabolischen Charakteristika von *Shewanella* dar. Allerdings fehlen orthologe Proteine zu LldD und DID aus *E. coli*. Untersuchungen im genetischen Umfeld der Permease LldP identifizierten ein bis dato unbekanntes Cluster Milchsäureoxidierender Enzyme DID-II und LldEFG (182) (Abb. 2). Damit ist es dem nichtfermentativen Bakterium *S. oneidensis* MR-1 möglich, die in einer komplexen mikrobiellen Gemeinschaft anfallende Milchsäure aufzunehmen und zu verwerten (107).

Ein metabolisches Modell für *S. oneidensis* MR-1, zusammengestellt aus genomischen Annotationen und unter Zuhilfenahme von Daten aus der Primärliteratur [Reed, J. L., unveröffentlicht], identifizierte 713 metabolische Reaktionen unter Beteiligung von 780 Genen und 623 Metaboliten (63).



In der abgebildeten metabolischen Rekonstruktion sind biochemische Transformationen in *E. coli* K12 und *S. oneidensis* MR-1 mit unterbrochenen und durchgehenden Pfeilen gekennzeichnet. Orthologe Gene sind dabei nach der gängigen Nomenklatur aufgeführt. Transkriptionale Regulation und zugehöriger Transkriptionsfaktor sind durch farbkodierte Punkte gekennzeichnet und in der Abbildung noch gesondert näher erklärt. GlcN: Glukosamin; GlcNAc: N-Acetyl-Glukosamin; KDG: 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphoglukonat; PEP: Phosphoenolpyruvat; P: Phosphat.

4.1.3 Regulation

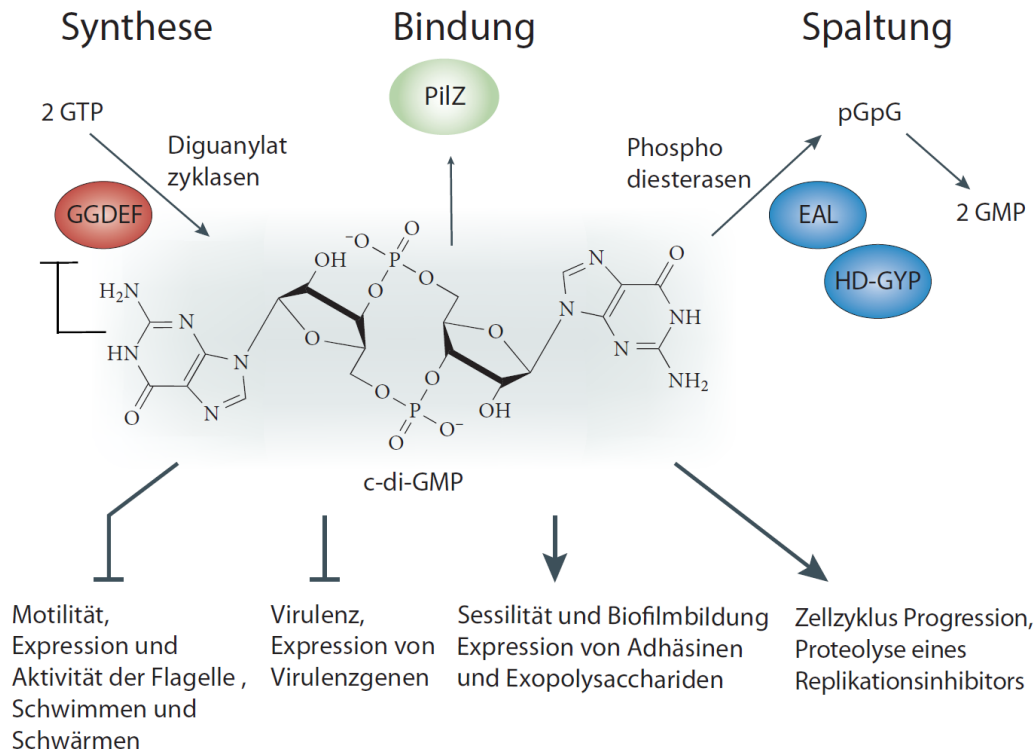
Regulatorische Signaltransduktionssysteme verknüpfen extra- und intrazelluläre Stimuli mit zellulären Antworten. Der Erfolg eines Organismus hängt entscheidend von der optimalen Anpassung an die jeweils vorherrschenden Bedingungen ab. Dabei spielen zum einen die bestehenden regulatorischen Mechanismen eine Rolle, wenn es um natürliche Schwankungen innerhalb der ökologischen Nische geht. Zum anderen ist aber auch die Flexibilität der Regulationsnetzwerke von Bedeutung, v. A. bei der Eroberung neuer Lebensräume mit verändertem Schwankungsbereich.

Mit 211 Ein-Komponenten-Signaltransduktionsproteinen (OCS-Proteine) und 97 Zwei-Komponenten-Proteinen (TCS-Proteine) (<http://mistdb.com/>) besitzt *S. oneidensis* MR-1 ein hervorragendes sensorisches und regulatorisches Potential um in einer gradientengeprägten Umwelt zu überleben. Im Vergleich dazu sind für den intrazellulär lebenden Parasiten *Hämophilus influenzae* 86-028NP nur 49 OCS-Proteine und neun TCS-Proteinen (<http://mistdb.com/>) bekannt. Das entspricht weniger als einem Fünftel regulatorischer Proteine dieser Art verglichen mit *S. oneidensis* MR-1.

Darüber hinaus kodiert das 5,1 Mbp große Genom von *S. oneidensis* MR-1 51 Diguanylatzyklasen, 27 Phosphodiesterasen, und 20 Hybriddiguanylatzyklasen oder Hybridphosphodiesterasen (<http://mistdb.com/>). *S. oneidensis* MR-1 gehört damit in die Gruppe von Mikroorganismen mit der größten Zahl von Bis-(3'-5')-zyklischem dimerem Guanosinmonophosphat (c-di-GMP) modifizierenden Proteinen bezogen auf die Genomgröße. *E. coli* MG1655 – zum Vergleich – kodiert nur für 17 Diguanylatzyklasen und 19 Phosphodiesterasen in einem 4,6 Mbp großen Genom (<http://mistdb.com/>). Vergleiche dieser Art geben Hinweise auf eine mögliche größere Bedeutung postranskriptionaler Kontrolle zellulärer Prozesse durch externe Stimuli bei.

Sekundäre Botenstoffe

Zyklische Signalkleotide sind an der Regulation zellulärer Prozesse sowohl bei Eukaryoten als auch Prokaryoten beteiligt (12, 31). In γ -Proteobakterien nimmt c-di-GMP Einfluss auf verschiedenste Funktionen wie Virulenz, Zellulosebiosynthese, Motilität, und Biofilmbildung (102, 251) (Abb. 3). Die Konzentration von intrazellulärem c-di-GMP erfolgt durch zwei Enzymgruppen. Die eine (Diguanylatzyklasen) erhöhen dabei die Konzentration von c-di-GMP durch Synthese aus zwei Molekülen GTP (102, 173, 194) (Abb. 3), die andere (Phosphodiesterasen) senken die Konzentration durch Spaltung in zwei Moleküle GMP (102, 195, 202) (Abb. 3). Über die Konsensus-GGDEF-Domäne für die Zyklasten und die Konsensus-EAL- / HD-GYP-Domäne für die Esterasen können diese Enzyme leicht identifiziert werden.



nach Hengge *et al.* 2009 (83)

Abb.3: **Struktur und physiologische Funktionen von c-di-GMP (83)**

Auf zellulärer Ebene wird der c-di-GMP Spiegel von Diguanylatzyklasen mit GGDEF-Domänen (rot) und spezifischen Phosphodiesterasen mit EAL- oder HD-GYP-Domänen (blau) kontrolliert. Auch kann c-di-GMP an PilZ-Domänenproteine (grün) binden und diese aktivieren. Dabei beeinflusst es nicht nur die Motilität (240) sondern wird auch bei der Expression von Virulenzgenen benötigt (216). C-di-GMP stimuliert in hohen Konzentration darüber hinaus eine Vielzahl Biofilm-assoziiierter Funktionen, wie die Ausbildung von Fimbrien oder anderen Adhäsinen sowie einer Vielzahl von Matrix-Exopolysacchariden (102, 194). In *Caulobacter crescentus* ist die präzise zeitliche und räumliche Anwesenheit von c-di-GMP ein Schlüssel im Zellzyklus (56).

Ebenso wie c-di-GMP spielt zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) eine wichtige Rolle als sekundärer Botenstoff in vielen Bakterien. Es dient hier vor allem der Aktivierung des Katabolitgen-Aktivatorproteins (CRP) (22). Aktiviertes CRP greift seinerseits in den Kohlenstoffmetabolismus ein, kann aber auch an der Regulation von Antibiotikabiosynthese, phototrophen Wachstum und Pathogenese beteiligt sein (22). Interessanterweise kontrolliert CRP in *S. oneidensis* MR-1 auch die anaerobe Respiration (196). Stämme mit einer Mutation in *crp* verlieren die Fähigkeit Fe(III), Mn(IV), Fumarat, Nitrat und DMSO zu reduzieren (196). Der Aktivierungsmechanismus für CRP unter anoxischen Bedingungen ist allerdings unklar, insbesondere deshalb weil Redoxsensorische Domänen fehlen. Als Sauerstoffsensorprotein arbeitet in anderen Bakterien FNR – der Fumarat/Nitratreduktions-Regulator (110). In *Shewanella* findet man ein orthologes Protein mit 73,6% Sequenzidentität. Doch konnte mittels Deletionsmutanten gezeigt werden, dass FNR für anaerobes Wachstum nicht essentiell ist (16, 139). Ein regulatorischer Zusammenhang mit CRP besteht daher nicht.

Die Aktivierung der anaeroben Fumaratreduktase unter aeroben Bedingungen durch Zusatz von cAMP in ein *E. coli* Kulturmedium legt den Schluss nahe, dass CRP indirekt über die Adenylatzyklaseaktivität reguliert wird (63). Das Genom von *S. oneidensis* MR-1 kodiert drei putative Adenylatzyklasen. Zwei davon – CyaA und CyaC – sind für anaerobes Wachstum mit Fumarat, Fe(III) und DMSO als terminaler Elektronenakzeptor von essentieller Bedeutung (35). Die Verlagerung der anaeroben Regulation von FNR zu CRP stellt möglicherweise die regulatorische Anpassung an dynamische Redoxbedingungen der Umwelt dar und gewährt *S. oneidensis* MR-1 die benötigte Flexibilität im Metabolismus.

Ein-und Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssysteme

Vergleichende Genomanalysen offenbarten eine relative Häufigkeit für das Auftreten dreier Klassen von Signaltransduktionsproteinen (192).

1. Proteine mit Verantwortlichkeit im Zyklische-Signalkleotide-Signalsystem
2. Chemotaxisproteine: Im Genom von *E. coli* kodiert nur ein einziger Gensatz für Chemotaxis inklusive 5 Chemorezeptoren (243), im Genom von *S. oneidensis* MR-1 hingegen findet man gleich 3 Gensätze mit 27 Chemorezeptorgenen (63). Interessant ist dabei, dass die Bewegung der Zellen in Richtung terminaler Elektronenakzeptoren – bei Abwesenheit von Sauerstoff – in *S. oneidensis* MR-1 die chemotaktische Antwort auf das Vorhandensein von Zuckern und Aminosäuren im Medium dominiert (17, 162).
3. PAS-Domänenproteine (Per-Arn-Sim): Die ubiquitär verbreitete PAS-Domäne ist an der Wahrnehmung von Umweltsignalen wie Licht, Sauerstoff und Redoxpotentialen beteiligt (218). Verglichen mit *E. coli* besitzt *S. oneidensis* MR-1 mehr als die doppelte Zahl an PAS-Domänenproteinen darunter 6 Histidinkinasen (HK). Damit sind allein fast 20% der TCS-Systeme in *S. oneidensis* MR-1 an der Wahrnehmung entsprechender Reize beteiligt (<http://mistdb.com/>).

4.2 Zwei-Komponenten-Signaltransduktion

Die Anpassung an sich ständig wandelnde Umweltbedingungen erfordert die Entwicklung effektiver Signaltransduktionssysteme. Die meisten Prokaryoten aber auch einige Eukaryoten nutzen dazu Phosphogruppentransferreaktionen unter Beteiligung zweier konservierter Komponenten, einer Histidinkinase HK und eines Antwortregulatorproteins (RR) (213). Im Jahre 1986 veröffentlichten Nixon, Ronson und Asubel ihre Entdeckungen über die Ähnlichkeiten von NtrB (RR) und NtrC (HK) aus *Bradyrhizobium* zu regulatorischen Proteinen aus *E. coli* und *Bacillus subtilis* (164). Ein Begriff aus dieser Publikation steht noch heute stellvertretend für diese Art von Reiz-Reaktionsprinzip: Zwei-Komponenten-Signaltransduktion.

4.2.1 Phosphogruppentransferchemie

Hinter diesem Reiz-Reaktionsprinzip der TCS stehen drei Phosphogruppentransferreaktionen und zwei Phosphoproteinintermediate (213).

1. Autophosphorylierung: $\text{HK-His} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{Mg}^{2+}} \text{HK-His}\sim\text{P} + \text{ADP}$
2. Phosphogruppentransfer: $\text{HK-His}\sim\text{P} + \text{RR-Asp} \xrightleftharpoons{\text{Mg}^{2+}} \text{HK-His} + \text{RR-Asp}\sim\text{P}$
3. Dephosphorylierung: $\text{RR-Asp}\sim\text{P} + \text{H}_2\text{O} \xrightleftharpoons{\text{Mg}^{2+}} \text{RR-Asp} + \text{Pi}$

Die γ -Phosphogruppe des ATP wird dabei erstens auf das N1 oder N3 eines konservierten Histidin innerhalb der Kinasedomäne übertragen. Der Antwortregulator katalysiert dann in einer zweiten Reaktion den Phosphogruppenübertrag auf ein konserviertes Aspartat innerhalb seines regulatorischen Bereichs, bevor in einem dritten Schritt die Hydrolyse zu freiem Phosphat erfolgt.

Phospho-Histidinchemie

Katalytisch gesehen verhalten sich HKs den Serin/Threonin/Tyrosin Proteinkinasen ähnlich, doch chemisch finden sich deutliche Unterschiede. Entstehen bei der Phosphorylierung von Ser/Thr/Tyr-Proteinkinasen Ester der Phosphorsäure, so bilden HK Phosphoamidate. Die Hydrolyse von Phosphoamidaten besitzt dabei eine weit größere negative Gibbs Energie ΔG als die von Phosphoestern (214) und so variiert auch der Gebrauch der verschiedenen Proteinkinasentypen in Abhängigkeit vom biologischen System (213). Bei der Autophosphorylierung am Histidin liegt das chemische Gleichgewicht auf Seiten der unphosphorylierten Form der Aminosäure. Es existiert also immer nur ein sehr kleiner Prozentsatz der HK-Population in phosphorylierter Form. Daraus ergibt sich, dass für die Funktionalität der HK eher der Phosphogruppenfluss als die Stöchiometrie der Phosphorylierung selbst eine Rolle spielen (213). Die energiereiche Bindung innerhalb des Phosphoamidates bildet damit die ideale Plattform für Phosphogruppentransferreaktionen.

Phospho-Aspartatchemie

Der Übertrag des Phosphatrestes auf ein Aspartat führt zur Bildung eines energiereichen Acylphosphates, das zu freiem Phosphat hydrolysiert wird. Interessanterweise unterscheiden sich aber die Hydrolysegeschwindigkeiten zwischen freien und proteingebundenen Acylphosphaten erheblich (180). So wäre es denkbar, dass Energie des Acylphosphates genutzt wird die Konformation eines Proteins und damit seine Aktivität zu ändern (103, 217). In dieser Rolle unterscheidet sich Asp-P von Ser/Thr/Tyr-P, denn bei letzterem wird die Proteinaktivität eher durch lokale elektrostatische Effekte beeinflusst (88, 106).

Die Halbwertszeiten phosphorylierter RR schwanken zwischen Sekunden über Stunden bis hin zu Tagen (85, 89, 101, 141, 234, 241). So besitzen viele RR Autophosphataseaktivität und verkürzen so Ihre Lebenszeit als Phosphoprotein. Umgekehrt kann die Phospho-Aspartatform aber auch signifikant die Halbwertszeiten freier Acylphosphate überschreiten (51, 114). Die Abstimmung der Hydrolysegeschwindigkeit von proteingebundenem Acylphosphat mit dem jeweiligen Reiz ist somit hervorragend geeignet, die Reaktionsdauer optimal zu koordinieren.

Darüber hinaus eröffnet die freie Reversibilität der Phosphogruppentransferreaktion neue Spielräume – durch Änderungen in der modularen Struktur eines TCS-System (Abb. 4 und 5) – den Reizfluss und die Reaktionsintensität zu steuern.

Acetylphosphat

In Anwesenheit hochenergetischer Acylphosphate katalysieren viele RR sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die eigene Phosphorylierung an dem gleichen Aspartatrest, der auch von der HK in der Transphosphorylierungsreaktion bedient wird (42, 44, 49, 136, 137, 175, 193). So könnte Acetylphosphat z.B. für ein basales Phosphorylierungsniveau des RR sorgen oder dieses sogar anheben. Als zentrales Intermediat im katabolen Stoffwechsel wäre es ein idealer Sensor globaler metabolischer Zustände (148), vor allem wenn man bedenkt, dass die Acetylphosphatkonzentrationen von weniger als 0,04 mM (Wachstum auf Glycerin) bis auf 1,2 mM (Wachstum auf Pyruvat) ansteigen kann (147).

Jedoch, der *in vivo* Beweis für die physiologische Bedeutung von Acetylphosphat in TCS-Kreisläufen kommt in allen Fällen aus Analysen mit Stämmen denen die entsprechende HK fehlt. Im Falle des Arc-Systems z.B. konnte klar gezeigt werden, dass die „Phosphatase“-Aktivität von ArcB die Acetylphosphatabhängige Phosphorylierung aufhebt (130).

4.2.2 Architektur

Durch den modularen Aufbau von TCS-Systemen können sowohl sehr einfache Reiz-Reaktions-Schaltkreise entstehen als auch hochkomplexe Regulationskaskaden gebildet werden. Generell können dabei drei Grundmuster unterschieden werden (Abb. 5).

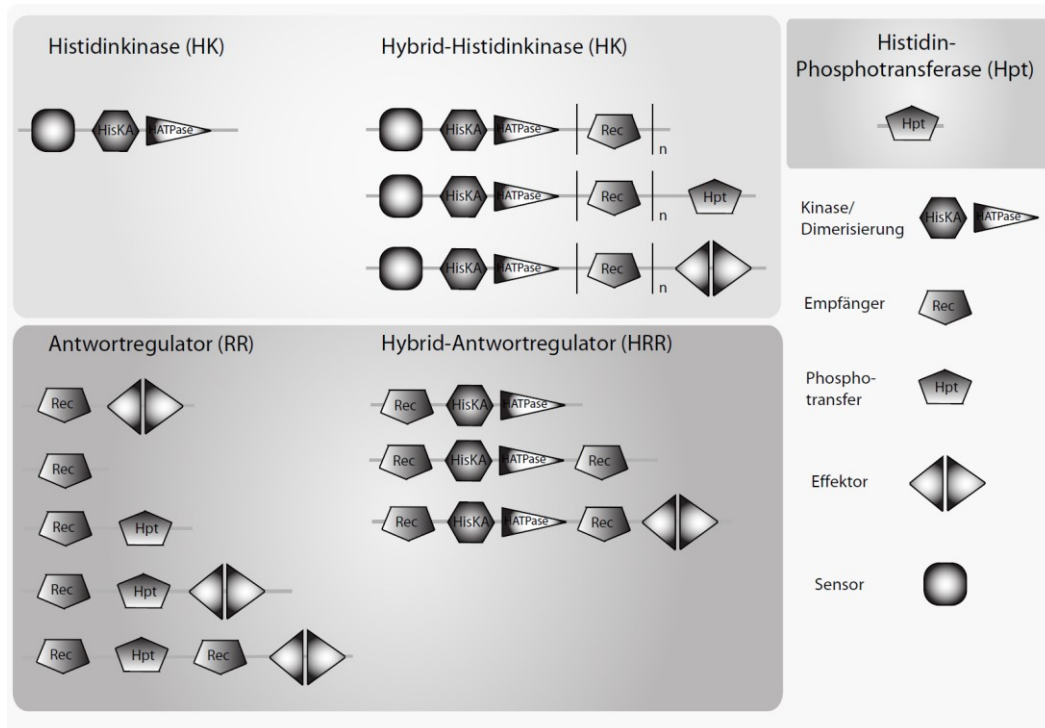


Abb.4: **Modulare Architektur von Zwei-Komponenten-Proteinen**

TCS-Proteine zeichnen sich wie hier gezeigt durch eine extensive Diversität bezogen auf die Domänenstruktur aus (<http://mistdb.com/>). So können z.B. Empfängerdomänen als Tandemwiederholungen auftreten, genauso wie multiple Sensordomänen - neben ihrem typischen Auftreten als Bestandteil von HKs und Hybrid-HKs - auch in RRs und Hybrid-RRs zu finden sind. Diese freie Kombinierbarkeit der einzelnen „Module“ ist Grundstein für die Diversifikation der TCS-Systeme (225, 247).

Osmoregulation in *E. coli*

Im prototypischen Fall der *E. coli* Osmoregulation (Abb. 5a) reagiert eine HK EnvZ auf einen Stimulus der Umwelt – Osmolarität – erzeugt daraufhin an einem internen Histidinrest eine hochenergetische Phosphogruppe und überträgt sie auf einen Aspartatrest des RR OmpR. Dies wiederum führt zu einer Konformationsänderung im regulatorischen Bereich des RR und aktiviert eine assoziierte DNA-Bindedomäne, die ihrerseits Genexpression der porinkodierenden Gene *ompB* und *ompC* steuert (62). Dieses Grundmuster eines TCS-Systems ist hoch anpassungsfähig, und eine Vielzahl von Variationen sorgt für die Optimierung spezifischer Signalsysteme. So muss der Phosphogruppenübertrag nicht direkt von HK zu RR sein, sondern kann indirekt in einem sogenannten Multistritt-Phosphorelaisystem erfolgen (213) (Abb. 5b und 5c). Dabei werden die Stufen der Phosphorylierung zweimal durchlaufen. Dies beinhaltet eine Phosphorylierung eines Histidins der HK, gefolgt von der Übertragung auf das Regulatorprotein und der anschließenden Phosphorylierung eines zweiten Histidins, das dieses Mal im Phosphogruppentransferprotein zu finden ist. Im letzten Schritt wird das Phosphat auf den RR übertragen.

Sporulationskontrolle in *B. subtilis*

Die Sporulationskontrolle in *B. subtilis* steht exemplarisch für solch ein Multischritt-Phosphorelaisystem (Abb.5b). So wird die Phosphogruppe von der HK erst an das Empfängerprotein (Rec-Protein) Spo0F und dann an die Histidin-Phosphotransferase (Hpt) Spo0B geleitet, bevor am Ende der Kaskade der RR Spo0A steht (29). Diese erhöhte Komplexität eines TCS erlaubt eine bessere Kontrolle besonders komplexer Prozesse sowie die Integration positiver und negativer Signale. Zwar wird allein der Phosphorylierungsstatus des RR Spo0A noch durch drei Phosphatasen (Spo0E, YisI und YnzD) kontrolliert (176), als zentraler Kontrollpunkt im Sporulationsprozess erweist sich aber das Empfängerprotein Spo0F. Hier wird nicht nur der Phosphorylierungsstatus durch eine Stimulation der intrinsischen Phosphataseaktivität Spo0Fs mittels der Proteine RapABE negativ reguliert (40, 93), sondern Spo0F bildet auch den Sammelpunkt ankommender Signale durch fünf Kinasen (KinA, KinB, KinC, KinD, und KinE) (181) und erlaubt somit eine Akkumulation verschiedener Stimuli auf einem molekularen Schalter (Spo0F) (181).

Die Interaktion solcher Schalter mit der(n) korrespondierenden Kinase(n) erfordert die räumliche Nähe beider Partner. Es ist daher keine Seltenheit, dass Rec oder Hpt nicht als freie Proteine vorliegen, sondern als Domänen mit der Kinase zu einer sogenannten Hybridkinase verschmelzen (Abb. 4 und 5c).

Anoxische Redoxkontrolle von *E. coli*

Die anoxische Redoxkontrolle Arc aus *E. coli* mit ArcA als RR und ArcB als HK ist ein Beispiel für TCS-Systeme mit Hybrid-HK (143). Im Gegensatz zu einer orthodoxen HK wie EnvZ (Abb. 5a) besitzt der Hybrid ArcB neben der Kinase- und ATPase-Domäne im regulatorischen Bereich eine zusätzliche Rec- sowie eine Hpt-Domäne (Abb.5c). Diese vergleichsweise komplexe Struktur eines TCS ermöglicht die Steuerung der Genexpression von mehr als 1000 Genen in Abhängigkeit eines schwankenden Sauerstoffgehaltes der Umwelt (129). Unter anaeroben Bedingungen wird die Phosphogruppe erst intern von ArcB-HK_{H292} (Kinasedomäne) über ArcB-Rec_{D576} (Rec-Domäne) an ArcB-Hpt_{H717} (Hpt-Domäne) weitergeleitet, bevor am Ende der RR ArcA phosphoryliert wird (71, 117). Die Verschiebung des Verhältnisses ArcA-P/ArcA zugunsten der phosphorylierten Form bewirkt dann mehrheitlich eine Repression regulierter Gene durch Bindung an die DNA und Unterdrückung der Transkription (143). Die lange Halbwertszeit von ArcA-P mit mehr als 60 min unter *in vitro* Bedingungen garantiert die Aufrechterhaltung dieser Repression, verhindert aber auch einen erneuten Transkriptionsstart bei steigenden Sauerstoffkonzentrationen (68). Das Phosphat muss daher durch einen alternativen Mechanismus entfernt werden. Dies geschieht durch eine Reversion des Phosphogruppenflusses (Abb. 8b) von Asp₅₄ im RR ArcA über ArcB-Hpt_{H717} zu ArcB-Rec_{D576} in der HK ArcB, nach Unterdrückung der Kinaseaktivität am ArcB-HK_{H292} (68, 118). Die intrinsische Phosphataseaktivität von ArcB-Rec_{D576} (71, 94) sowie eine Dephosphorylierung von ArcB-Hpt_{H717} durch

die Histidin-Phosphatase SixA (170) sorgen dabei für die Feinjustierung der Phosphorylierungslevel entsprechend dem Sauerstoffgehalt.

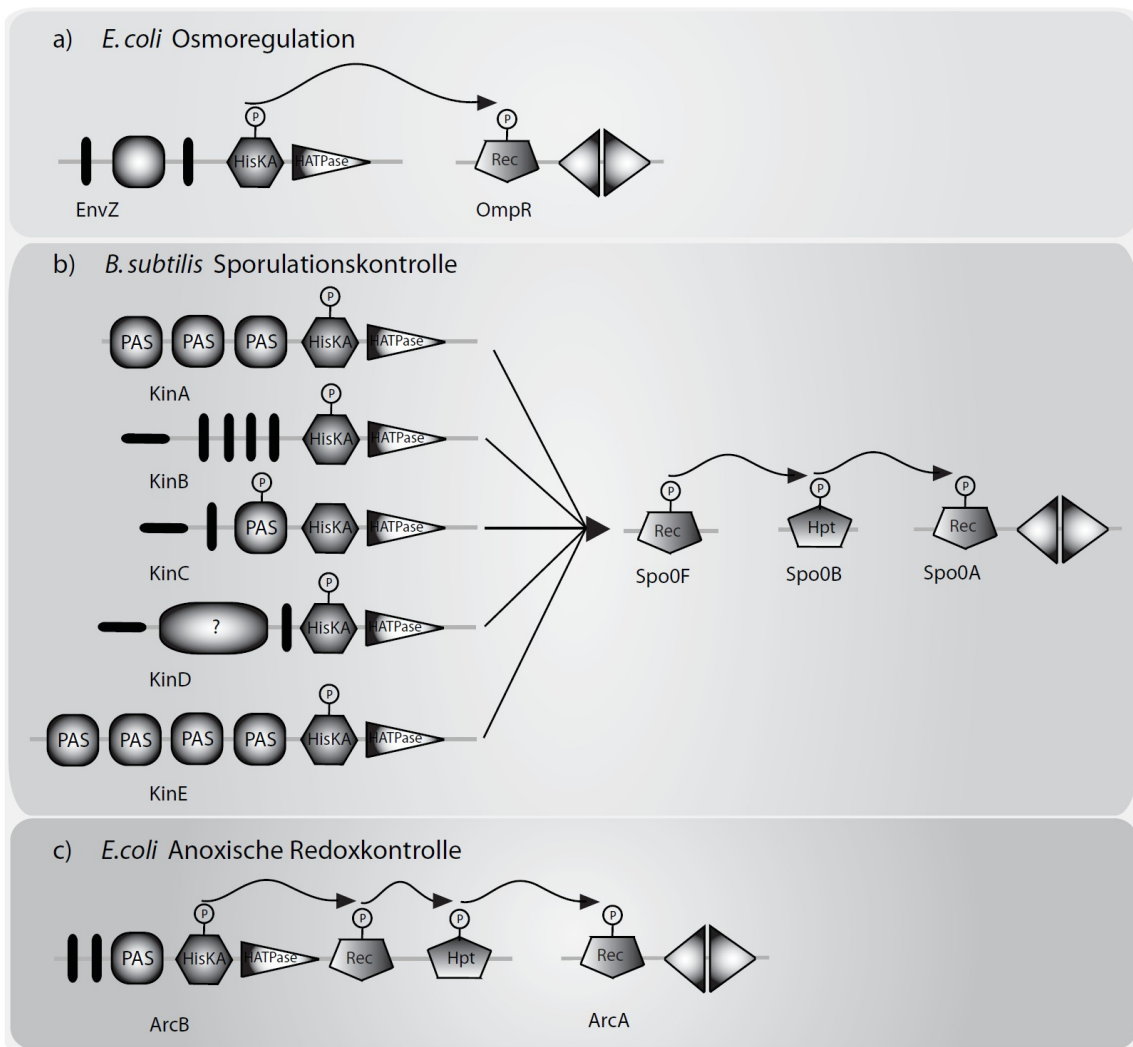


Abb.5: Diversifikation der Regulationsschaltkreise in TCS-Systemen

Aus der hohen Variabilität im Aufbau von TCS-Proteinen ergibt sich eine ebenso hohe Variabilität im Phosphogruppentransferschema. a) *E. coli* Osmoregulation: Hier überträgt die orthodoxe HK EnvZ eine Phosphogruppe direkt auf den RR OmpR der seinerseits als Transkriptionsfaktor dient. b) *B. subtilis* Sporulationskontrolle: Fünf orthodoxe HK KinA-E akkumulieren empfangene Signale in Form eines Multischritt-Phosphorelaisystems über das Einzel-Empfänger-Protein Spo0F und die Hpt Spo0B auf dem Antwortregulator Spo0A. c) *E. coli* Anoxische Redoxkontrolle: Hier sind Rec-protein und Hpt mit der HK ArcB zu einer Hybrid-HK verschmolzen. Der Multischritt-Phosphogruppenübertrag findet bereits intern statt, bevor am Ende der RR ArcA phosphoryliert wird. Das eingekreiste P steht für einen phosphorylierten katalytischen Rest, die geschwungenen Pfeile markieren einen Phosphogruppenübertrag. Die Symbolik ist analog zu Abb. 4.

Die Entscheidung ob ein TCS-System eher einfach aufgebaut ist wie das der *E. coli* Osmoregulation oder ob Phosphorelaisysteme wie die Sporulationskontrolle aus *B. subtilis* respektive die Anoxische Redoxkontrolle in *E. coli* zum Einsatz kommen, ist stark von Reiz und Reizantwort abhängig. Generell aber steigt mit zunehmender Komplexität der Reize und Reizantworten auch die Komplexität der zugehörigen Regulationssysteme.

4.2.3 Verteilung und Verbreitung

Die ständig wachsende Zahl an sequenzierten Genomen offenbart TCS-Systeme als Bestandteil aller Superreiche. Jedoch ist die Verteilung und Verbreitung innerhalb der Bakterien, Archaeen und Eukaryoten sehr ungleich (242). In 864 von 899 verfügbaren, komplett sequenzierten bakteriellen Genomen findet man TCS-Systeme verteilt über alle 21 phyletischen Gruppen (Tabelle 2). Einzig in einigen Pathogenen (z.B. *Mycoplasma*) und Endosymbionten (z.B. *Amoebophilus*) mit stark reduzierten Genomen fehlen sie (242). Im Gegensatz zu den Bakterien findet man TCS-Systeme nur in 50% der Genome von Archaeen (Tabelle 2). Dabei existieren sie weder in den *Crenarchaeota*, *Korarchaeota* und *Nanoarchaeota*, kommen aber in 33 von 42 Genomen der *Euararchaeota* und dem *Thaumarchaeotum*, *Nitrosopumilus maritimus* SCM1, vor (242). Eukaryotische Genome kodieren sogar nur in 30% der Fälle TCS-Systeme (Tabelle 2). So nutzen Pilze, Pflanzen und Schleimpilze TCS-Systeme, in der Gruppe der Protisten und Metazoen hingegen sind sie unbekannt (242).

So divers wie die Verteilung der TCS über die Reiche, ist auch der Einsatz von Hybrid-HK und Hybrid-RR in Bakterien, Archaeen und Eukaryoten. So machen Hybrid-HK weniger als 20% aller HK in Bakterien aus und in 5 von 21 phyletischen Gruppen fehlen sie völlig (242) (Tabelle 2). Im Gegensatz dazu sind mehr als 90% aller eukaryotischen HK Hybride und man findet sie in allen Gruppen, die TCS nutzen (242) (Tabelle 2). In Archaeen wiederum machen Hybrid-HK nur 1% aller HK aus (242) (Tabelle 2). In der Gruppe der hybriden RR findet man aber interessanterweise eine zu den Hybrid-HK inverse Verteilung (Tabelle 2). So sind mehr als 30% der archaealen RR Hybride in Bakterien kommen sie nur zu ca. 3% vor und in Eukaryoten fehlen sie gar völlig (242) (Tabelle 2).

Tabelle 2: Genomische und phyletische Verbreitung von TCS-Komponenten

	Bakterien	Archaeen	Eukaryoten
Genomisches Auftreten			
Genome gesamt	899	67	55
Histidinkinasen	857	30	1
Hybrid-Histidinkinasen	561	5	15
Antwortregulatoren	862	34	15
Hybrid-Antwortregulatoren	258	17	0
Histidin-Phosphotransferasen / Andere	220	2	15
Taxonomische Verbreitung			
Taxonomische Gruppen	21	5	5
Histidinkinasen	21	3	1
Hybrid-Histidinkinasen	16	1	3
Antwortregulatoren	21	2	3
Hybrid-Antwortregulatoren	15	1	0
Histidin-Phosphotransferasen / Andere	11	1	3
TCS-Proteine absolut			
Histidinkinasen	20.862	546	7
Hybrid-Histidinkinasen	4.717	8	86
Antwortregulatoren	26.962	304	80
Hybrid-Antwortregulatoren	923	142	0
Histidin-Phosphotransferasen / Andere	329	4	18

4.2.4 Evolution

Die Entstehung der TCS sowie deren Ausbreitung und Diversifikation innerhalb der drei großen Reiche des Lebens kann mittels bioinformatischer Analysen visualisiert und nachvollzogen werden. Auf der Basis von Sequenzähnlichkeiten konservierter Domänen werden TCS-Proteine mittels Blast (7) oder dem Hidden-Markov-Modell (113) klassifiziert. Aber auch Domänenanalysen werden genutzt, TCS-Proteine einzustufen (6). Phylogenetische Bäume allein geben oft schon Aufschluss über Beziehungen zwischen den Klassen (113, 247). Gleichfalls ermöglicht die Domänenstruktur Aussagen über die Evolutionsgeschichte der TCS-Proteine (225). Tiefergehende Untersuchungen beziehen zusätzlich relative Häufigkeit und Verbreitung mit ein und knüpfen so evolutionäre Beziehungen (225, 247).

Aufgrund des einfacheren Aufbaus, der größeren relativen Häufigkeit, und der Mannigfaltigkeit sowohl sensorischer als auch regulatorischer Domänen nimmt man die OCS als Vorläufer der TCS an (225). Gestützt wird diese These durch die Aussage, dass der letzte gemeinsame Vorfahr der drei Reiche des Lebens wahrscheinlich ein solches System besaß. Die TCS hat sich dann später in einem frühen Bakterium entwickelt und diversifiziert (225). Durch vielfache Ereignisse horizontalen Gentransfers streute die TCS auch in Archaeen und Eukaryoten (113) und setzte sich bis heute als Reiz-Regulationsmechanismus erfolgreich durch. Dabei besitzen verwandte Arten orthologe TCS-Systeme, die Antworten auf die gleichen Signale der Umwelt vermitteln (177). In einigen Fällen decken sich die Antworten zwischen verschiedenen Arten. In anderen Fällen jedoch unterscheiden sie sich sowohl qualitativ als auch quantitativ und spiegeln so Anpassungen an die entsprechende ökologische Nische wider. Insbesondere diese Unterschiede blieben bis in die jüngste Vergangenheit verborgen (177). Das Wissen war beschränkt auf einige wenige Modellorganismen phylogenetisch weit auseinander liegender Gruppen mit geringen genetischen Überlappungsbereichen (177). Die steigende Zahl bioinformatischer und experimenteller Studien aus den letzten Jahren an näher verwandten Arten gaben aber erste Einblicke in die Evolution von TCS-Kreisläufen. Eine zentrale Rolle nehmen hierbei die RR ein, die spezielle DNA-Sequenzen binden und so als Transkriptionsfaktoren unmittelbar die Genexpression steuern.

DNA-Bindestellen

Der Verlust ursprünglicher und die Rekrutierung neuer DNA-Bindestellen für Transkriptionsfaktoren ist hauptverantwortlich für die Evolution der Genregulation in höheren Eukaryoten (21, 50, 53, 152, 168, 224). Einzelne Gene können so artspezifisch differentiell transkribiert werden ohne die Expression koregulierter Gene zu beeinflussen. Auch in verwandten Bakterien regulieren orthologe Transkriptionsfaktoren unterschiedliche Gene. Genomweite experimentelle Analysen zeigten, dass nur ca. 30% der durch den RR PhoP regulierten Gene in *Salmonella enterica* auch in *Yersinia pestis* und anderen Bakterien reguliert sind (178). Am Beispiel der Polymyxin B - Resistenz in *Enterobacteriaceae* (Abb. 6) wird deutlich, wie die Evolution von DNA-Bindestellen Regulationskreisläufe beeinflusst und spezie-spezifische Antworten auf gleiche Stimuli entstehen (47, 177).

Architektur regulatorischer Kreisläufe

Die Architektur orthologer Regulationssysteme kann spezies-spezifisch, von direkter transkriptionaler Kontrolle bis hin zu komplexen vielstufigen Regulationskreisläufen variieren. Das schließt Feedback- und Feedforward-Schleifen, sowie regulatorische Kaskaden mit ein (4). Solche strukturellen Variationen in orthologen Regulationssystemen haben entscheidenden Einfluss auf Grad oder/und die Kinetik mit der Genprodukte synthetisiert werden (4).

Wie in Abb. 6 erläutert, kontrollieren *S. enterica* und *Y. pestis* die Transkription der Polymyxin B – Resistenzgene *pbgP* und *ugd* in voneinander abgewandelten Regulationskreisläufen in Abhängigkeit der Mg^{2+} -Konzentration (238). Mathematische Modelle zeigen für den indirekten Regulationskreislauf aus *Salmonella* Signalamplifikation, Expressionspersistenz und Expressionsverzögerungen, relativ zur direkten Regulation in *Y. pestis* (177). Der Austausch des die Polymyxin B-Resistenz vermittelnden Kreislafs in *Yersinia* mit dem Kreislauf aus *Salmonella* sorgte dann in dem rekombinanten *Y. pestis* Stamm für eine erhöhte Resistenz gegen Polymyxin B (109) und verdeutlicht einmal mehr die Bedeutung der Evolution regulatorischer Systeme in Abhängigkeit von der ökologischen Nische in der ein Organismus lebt.

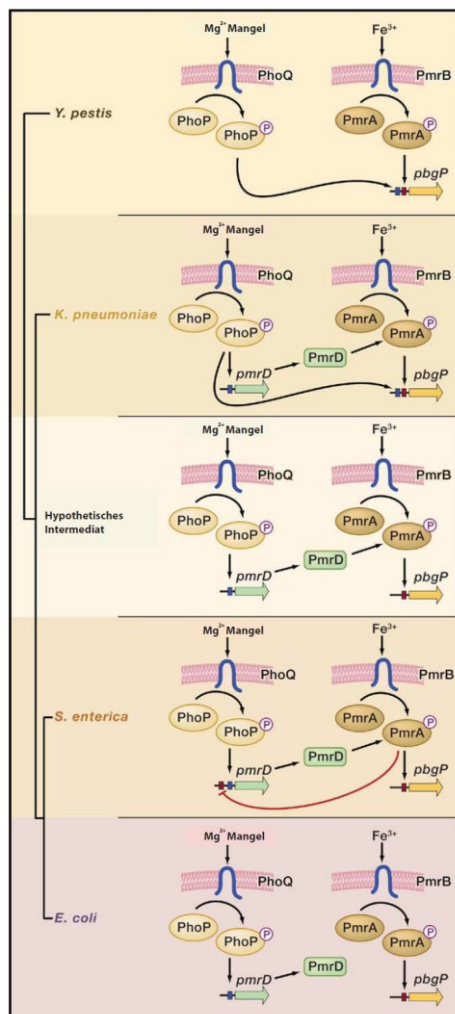


Abb.6: Evolution der Regulationssysteme der Polymyxin B Antibiotikaresistenz (177)

Regulatorische Kreisläufe steuern die Expression von *pbgP* und vermitteln so eine Resistenz gegen das Peptidantibiotikum Polymyxin B in Enterobakterien. Der Schaltkreis in *Yersinia pestis* beinhaltet die direkte transkriptionale Kontrolle von *pbgP* durch PhoP, welches seinerseits in Anwesenheit von Mg^{2+} durch PhoQ aktiviert wird. Darüber hinaus stimuliert das PmrAB-TCS-System die *pbgP*-Expression in Anwesenheit von Fe^{3+} . So findet man in der Promotorregion von *pbgP* (*Y. pestis*) sowohl DNA-Bindemotive für PhoP (blaue Box) und PmrA (rote Box). *Y. pestis* repräsentiert damit möglicherweise den Urtyp der *pbgP* Regulation. Vergleicht man diesen Regulationskreislauf mit denen aus anderen Enterobakterien, so ist die direkte transkriptionale Kontrolle von *pbgP* durch PmrAB in Antwort auf Fe^{3+} konserviert. Die Ausprägung der Polymyxin B Resistenz in Abh. von Mg^{2+} -Mangelbedingungen variiert spezies-spezifisch. In *S. enterica* z.B. wird die Polymyxin B Resistenz unter Mg^{2+} -Mangelbedingungen indirekt vermittelt, indem PhoP die Expression von *pmrD* stimuliert. PmrD seinerseits aktiviert PmrA, welches wiederum in einer Feedback-Schleife die Expression von *pmrD* negativ reguliert. Der Regulationsschaltkreis in *Klebsiella pneumoniae* beinhaltet beides sowohl die direkte Regulation von *pbgP* wie in *Y. pestis* als auch die indirekte Regulation wie in *S. enterica*, verzichtet aber auf die dortige negative Feedback-Schleife. *E. coli* zuletzt exprimiert keine PmrA aktivierten Gene in Abh. von Mg^{2+} -Mangel möglicherweise weil ein stark diversifiziertes *E. coli* PmrD die Fähigkeit verloren hat PmrA zu binden. Damit ist auch hier die Ausprägung einer Polymyxinresistenz auf Abhängigkeit zu Fe^{3+} beschränkt.

Kern- und Spezies-spezifische Funktionen konservierter Regulationssysteme

Das Regulon konservierter Regulationssysteme kann auf der Grundlage phylogenetischer Untersuchungen in zwei Gruppen unterteilt werden (Abb. 7). Die eine Gruppe des Regulons umfasst Gene, die in allen Spezies mit dem entsprechenden Regulationssystem vorkommen und gleichzeitig von diesem reguliert werden (Abb. 7). Die andere Gruppe umfasst einen variablen Satz spezies-spezifischer Gene (Abb. 7) (177).

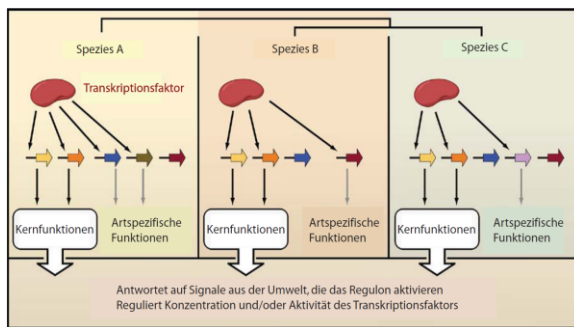


Abb.7: **Funktionen von Transkriptionsfaktoren (177)**

Drei verwandte Bakterienarten (Spezies A, B, C) mit konserviertem orthologen Transkriptionsfaktor variieren in den Genen, die sie regulieren. Nur zwei Zielgene (gelb und orange) werden in allen drei Arten reguliert. Sie vermitteln die sogenannten Kernfunktionen, die direkt auf ein Signal aus der Umwelt antworten oder Menge und Aktivität des Transkriptionsfaktors bestimmen. Im Gegensatz dazu gibt es in jedem Bakterium Gene die von dem Transkriptionsfaktor spezies-spezifisch reguliert werden (grün, blau, braun und lila). Sie stellen eine Anpassung an die jeweilige ökologische Nische dar.

Untersuchungen an verschiedenen regulatorischen Systemen ordnen den beiden Gruppen sehr unterschiedliche Funktionen zu (177). Der Kernsatz an Genen kodiert für Proteine zuständig für die Regulation des Regulationssystems und für Proteine, die in direktem Zusammenhang mit dem Stimulus stehen, der für die Aktivierung des Regulationssystems verantwortlich ist (177). Die spezies-spezifischen Gene im Regulon dagegen, stehen im Zusammenhang mit dem Überleben in der ökologischen Nische, die der Organismus besiedelt (178, 191).

Spezies-spezifische Gene und horizontaler Gentransfer

Nahe verwandte eukaryotische Spezies unterscheiden sich nur sehr geringfügig bezogen auf die Proteine für die sie kodieren. So findet man zu mehr als 99% aller proteinkodierenden Mause Gene auch ein Ortholog im Menschen (233). Im Gegensatz dazu überlappen die Genome uropathogener, enterohämorrhagischer und kommensalischer *E. coli* nur zu etwa 39,2% (235). Die z.T. drastischen phänotypischen Unterschiede in nahe verwandten Arten spiegeln daher deutlich die extensiven Modifikationen wider, welchen bakterielle Genome unterzogen werden – nicht zuletzt durch massiven horizontalen Gentransfer. Bakterien erlangen so schnell neue Eigenschaften wie Virulenz, Antibiotikaresistenz oder die Fähigkeit neue Kohlenstoff- oder Energiequellen zu nutzen (167, 171). Horizontal erworbene DNA-Sequenzen akkumulieren oft in bestimmten Genregionen sogenannten Inseln (177). Diese Inseln kodieren sowohl die Strukturgene für die neue Fähigkeit, als auch regulatorische Elemente, welche die Expression der Strukturgene steuern (177). Trotzdem kann ein Bakterium nur dann von der neuen Eigenschaft profitieren, wenn sie zur rechten Zeit und im Einklang mit ursprünglichen Eigenschaften ausgeprägt wird. Daher werden neuen Eigenschaften in bestehende regulatorische Netzwerke integriert (54). Zum Beispiel wird die Pathogenitätsinsel SPI-2 in *S. enterica* durch das im selben Genlokus kodierte TCS-System SsrB/SpiR reguliert (58), welches seinerseits unter der Kontrolle

der TCS-Systeme OmpR/EnvZ, und PhoP/PhoQ steht (58). Die Omnipräsenz horizontal transferierter Gene führte sogar soweit, dass einige ursprüngliche Regulationssysteme primär deren Expression steuern und nur noch sekundär ursprüngliche Funktionen ausüben. So findet man z.B. zu mehr als der Hälfte der Gene, die durch PhoP/PhoQ in *Salmonella* reguliert werden kein orthologes Gen, geht man mit seiner Suche über die Gattungsgrenzen hinaus (178).

Zusammengefasst kann man sagen, dass horizontal transferierte Gene eher komplexer reguliert sind als ursprüngliche (185, 188). So sollen Nebeneffekte unphysiologischer Ausprägung einer für den Organismus neuen Eigenschaft vermieden werden.

Verluste und Zugewinne von Transkriptionsfaktoren

Bioinformatische Analysen mit den regulatorischen Netzwerken der Transkriptionsfaktoren aus *E. coli* und *B. subtilis* als Sonden zeigten für hunderte von bakteriellen Spezies, dass Transkriptionsfaktor/Zielgen-Paare auch zwischen nahe verwandten Arten kaum konserviert sind (8, 134, 186). Mehr noch, wenn überhaupt eine Konservierung besteht, betrifft diese eher die Zielgene als die zugehörigen Regulationssysteme.

Untersuchungen an 30 sequenzierten γ -proteobakteriellen Genomen auf das Vorhandensein von Transkriptionsfaktoren offenbarte dass nur 13 von 143 Transkriptionsfaktoren in allen 30 Genomen zu finden sind (84). Diese 13 sind globale Regulatoren oder stehen an der Spitze einer regulatorischen Kaskade (84). Allgemein gesprochen: Je mehr Zielgene ein Transkriptionsfaktor besitzt, desto breiter ist er phylogenetisch verteilt.

4.3 Anoxische Redoxkontrolle – Das Arc-Zwei-Komponenten-System

Vor der Entstehung photosynthetisch aktiver Bakterien und Archaeen war Sauerstoff in der Erdatmosphäre praktisch nicht existent. Die Anreicherung großer Mengen gelösten Sauerstoffs in den Ozeanen und freien Sauerstoffs in der Atmosphäre vor 2,5-1,6 Mrd. Jahren brachte das anaerobe Leben jener Zeit fast zum Aussterben (32). Doch genauso groß wie der Schaden, angerichtet durch Reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) (253), an einer Zelle auch sein kann, so enorm ist auch der energetische Gewinn durch die aerobe Respiration (143). Fakultativ anaerobe Bakterien wie z.B. *E. coli* und *S. oneidensis* MR-1 passen ihren Stoffwechsel je nach Sauerstoffverfügbarkeit an. Dabei steht die aerobe Respiration in der Hierarchie klar über der anaeroben, die ihrerseits dem fermentativen Stoffwechsel vorgezogen wird (143). Diese Hierarchien einzuhalten und den Metabolismus entsprechend anzupassen, bedarf es regulatorischer Systeme die bereits durch Kontrolle der Transkription die Stoffwechselwege entsprechend beeinflussen. Oft arbeiten auf dieser Kontrollebene mehrere Sensor-Regulatorproteine zusammen (Abb.8 und 9). Ihr Zusammenspiel ermöglicht eine optimale differentielle Genexpression.

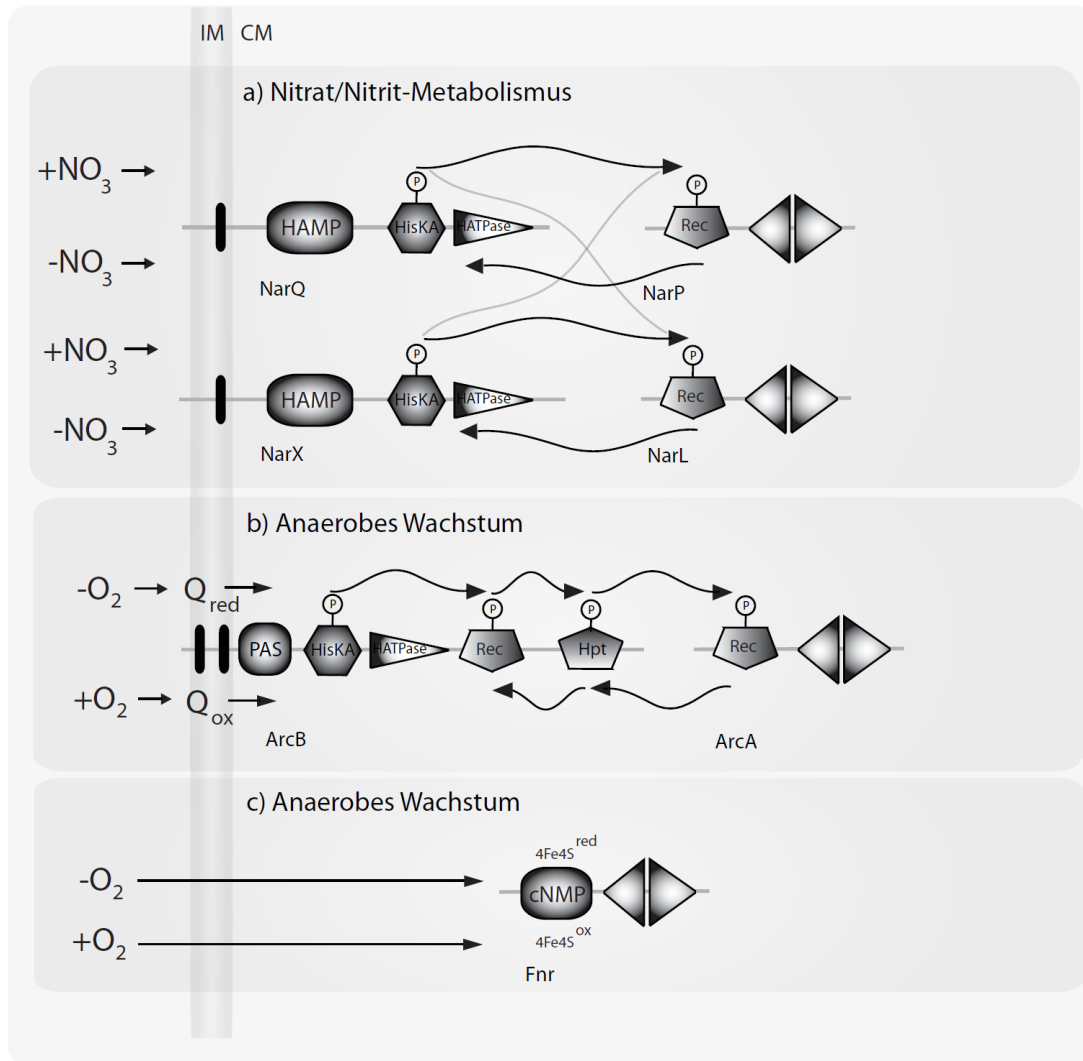
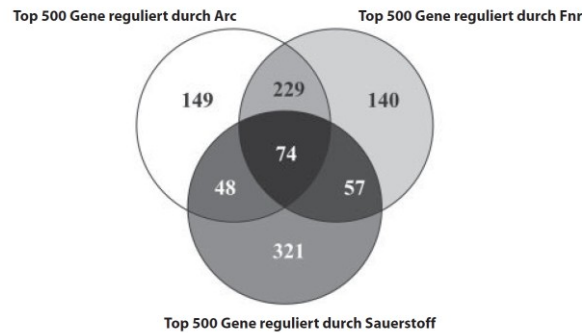


Abb.8: Genregulation in Abhängigkeit von Sauerstoff und Nitrat in *E. coli*

Sauerstoff, Nitrat und Fumarat bilden in *E. coli* die drei wichtigsten terminalen Elektronenakzeptoren. Ihr Vorhandensein oder ihre Abwesenheit unterliegt komplexen Regulationsmechanismen. a) Die TCS-Systeme NarX/L und NarQ/P messen den Nitrat/Nitritgehalt der Umgebung und antworten mit entsprechender Regulation der Gene im Nitrat/Nitritstoffwechsel. b) Das Arc-TCS misst den Sauerstoffgehalt der Umgebung über den Oxidationsstatus des Chinon-Reservoirs der inneren Membran und leitet in Abh. davon eine Antwort ein. c) Der Transkriptionsfaktor FNR misst den Gehalt an gelöstem Sauerstoff in der Zelle direkt über ein 4Fe4S-Cluster und kontrolliert so die Gene des anaeroben Metabolismus. Gerade Pfeile zeigen den Weg des Signals zum Sensor; Geschwungene Pfeile zeigen die Wege des Proteingebundenen Phosphates (P). IM: Zytoplasmamembran; CM: Zytoplasma

Unter anaeroben Bedingungen ist der bevorzugte Elektronenakzeptor Nitrat. Sein Metabolismus wird durch die TCS-Systeme NarX/L (211, 212) und NarQ/P (187, 211) gesteuert (Abb. 8a). Die transkriptionale Antwort auf Sauerstoff vermitteln das ArcA/B TCS-System (95, 98) (Abb. 8b) und der globale Regulator FNR (121) (Abb. 8c).

Unter anaeroben Wachstumsbedingungen stimuliert FNR dabei die Produktion von Proteinen beteiligt an der anaeroben Respiration und reprimiert gleichzeitig die Expression von Genen deren Produkte unter aeroben Bedingungen Funktionen übernehmen. Vergleiche der Expressionsprofile von *E. coli* Δfnr mit *E. coli* $\Delta arcA$ zeigten dass $\frac{2}{3}$ der Gene deren Expression in *E. coli* Δfnr betroffen ist auch durch ArcA reguliert werden (197, 198) (Abb. 9). Als globales TCS-System reguliert damit ArcA/B genau wie das Regulatorprotein FNR die Antwort auf schwankenden Sauerstoffgehalt der Umwelt.



nach Salmon *et al.* 2005 (198)

Abb.9: Zusammenspiel der globalen Regulationssysteme Arc und FNR in Abhängigkeit von Sauerstoff

In der Regulation auf verschiedene Sauerstoffkonzentrationen in der Umgebung arbeiten die globalen Regulatoren Arc und FNR zusammen. Das Venn-Diagramm zeigt dabei jeweils die 500 prominentesten Gene in der Regulation durch Arc (oben rechts), FNR (oben links) und Sauerstoff (unten Mitte).

4.3.1 Arc-Regulon in *E. coli*

Obwohl ArcA und ArcB anfänglich nur identifiziert wurden, in trans das die Succinat-Dehydrogenase kodierende Operon *sdh* zu kontrollieren (95, 98), stellte sich bald heraus, dass Mutationen in *arcA* oder *arcB* pleiotrope Effekte auf die Produktion vieler aerob arbeitender Enzyme haben. Das schließt Enzyme des Krebszyklus, Enzyme beteiligt an der β -Oxidation von Fettsäuren, Flavoproteine, und die Ubichinon-Oxidase mit ein (98). So findet man im Krebszyklus die Expression der Gene der Citratsynthase, der Aconitase, der Isocitrat-Dehydrogenase, der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase, der Succinat-Dehydrogenase, der Fumarase und der Malat-Dehydrogenase betroffen (143). Darüber hinaus ist in *E. coli* Δarc auch die Expression von Genen erhöht, die für die Zulieferung von Kohlenstoffvorstufen in den Krebszyklus nötig sind. Dazu zählen L-Lactat-Dehydrogenase, D-Lactat-Dehydrogenase, und Pyruvat-Dehydrogenase (143). Im Fettsäureabbau gehören die Acyl-CoA-Dehydrogenase und die 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase, im Glyoxalatzyklus die Isocitrat-Lyase und im Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferasesystem (PEP-PTS) HCBGlc, zu den Proteinen, deren Produktion in *E. coli* Δarc verändert ist (105).

Aufgrund der Tatsache, dass in *E. coli* Δarc die meisten Zielgene eine erhöhte Genexpression zeigen, wurde angenommen, dass ArcA in seiner aktiven Form als Repressor arbeitet. Später konnte jedoch ArcA in Funktion eines Aktivators nachgewiesen werden. Zum Beispiel die Produktion der Pyruvat-Formiat-Lyase, einem Enzym, bei fermentativen Bedingungen für die Spaltung von Pyruvat – unter Freisetzung von Ameisensäure – verantwortlich, wird von ArcA unter anaeroben Bedingungen stimuliert (201).

Die bisher angesprochenen Proteine sind auf die eine oder andere Weise am respiratorischen Metabolismus beteiligt, doch beeinflusst das Arc-TCS-System darüber hinaus auch die Produktion von Proteinen deren Funktion in keinem Zusammenhang mit dem katabolen Stoffwechsel steht. Dazu gehören Proteine, die am F-Plasmid-Transfer beteiligt sind (96, 207, 208), das Nukleotid-Excisions-

Reparaturprotein UvrA (169) und sogar der generelle Stress-Sigmafaktor RpoS werden in ihrer Produktion auf transkriptionaler Ebene direkt negativ reguliert (150).

Man geht heute davon aus, dass zwischen 100 und 150 Operons in *E. coli* direkt über das Arc-TCS-System reguliert sind und ca. 9 % aller offenen Leserahmen (ORF) in *E. coli* direkt und/oder indirekt durch Arc beeinflusst werden (129).

4.3.2 Antwortregulator ArcA in *E. coli*

ArcA wurde vor mehr als 25 Jahren als Dye-Protein identifiziert weil sich *arcA*-Deletionsstämme sich in Anwesenheit der Farbstoffe Toluidinblau und Methylenblau wachstumssensitiv verhielten (55). Das Gen *arcA* kodiert ein ca. 29 kDa großes Polypeptid mit 238 Aminosäuren (aa). Sequenzvergleiche mit anderen bakteriellen Proteinen zeigten, dass ArcA ein typischer Antwortregulator ist, bestehend aus einer aminoterminalen Rec- und einer carboxyterminalen Helix-Turn-Helix-DNA-Bindedomäne (98). Das konservierte ArcA_{D54} innerhalb der Rec-Domäne wird während der Signalübertragung von der HK auf den RR phosphoryliert und aktiviert ArcA als Transkriptionsregulator (104). Vermutlich existiert ArcA in seiner inaktiven Form als Dimer und bildet nach Phosphorylierung oktamere Strukturen aus (104). Diese Strukturen bestehen im Verhältnis 1:1 aus einem phosphorylierten und einem unphosphorylierten Protein (104). An dieser Oligomerisierung sind sowohl die DNA-Bindedomäne als auch die Rec-Domäne beteiligt (104).

4.3.3 Sensorkinase ArcB in *E. coli*

Die HK ArcB komplettiert als Interaktionspartner von ArcA das Arc-TCS-System. Das Gen *arcB* kodiert für ein 778 aa langes und 88 kDa schweres Protein. Zwei Transmembran-Domänen (TM-Domäne) verankern über eine kurze periplasmatische Brücke ArcB in der Membran (99, 119). Eine Linker-Region mit putativen *Leucin*-Zipper (68) und PAS-Domäne (218) verbindet die zweite TM-Domäne mit der katalytischen Region der HK. Diese besteht N-terminal aus einer primären Transmitter-Region (Kinasedomäne) mit dem konservierten ArcB-HK_{H292}, einer zentralen Rec-Domäne mit dem konservierten ArcB-Rec_{D576} und einer zweiten Transmitter-Region (Hpt-Domäne) mit einem konservierten ArcB-Hpt_{H717} (92, 97) (Abb. 13).

Transmembranregion

Die meisten HK besitzen periplasmatische Regionen mit einer Länge von ca. 150 aa und man nimmt an, dass diese Region eine Rolle in der Signalaufnahme spielt (215). Im Gegensatz dazu umfasst der periplasmatische Bereich von ArcB nur 16 aa. Das wirft die Frage auf ob dieser Bereich an der Signalaufnahme beteiligt ist. Sowohl Mutagenesen in der periplasmatischen Region als auch Substitutionen der TM-Domäne mit entsprechenden Fragmenten von MalF brachten Proteine hervor die in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt waren (119). Die TM-Domänen dienen daher möglicherweise nur

als Membrananker, welcher eine Interaktion der zytoplasmatischen Region ArcBs mit Elementen, die am Elektronentransport über die Membran beteiligt sind, ermöglicht (143).

Leucin-Zipper

An die TM-Domänen schließt sich eine aa-Sequenz an, die als strukturelles Element einen sogenannten Leucin-Zipper aufweist (1). Dieser ist gekennzeichnet durch vier Leucinreste im Abstand von je sieben aa sowie einer amphipatischen Helix mit hydrophoben Resten auf der einen Seite und hydrophilen Resten auf der anderen Seite. Dieses Strukturelement ist an der Bildung homodimerer oder heterodimerer Proteine unter Ausprägung einer dimeren Coiled-Coiled-Struktur beteiligt. Normalerweise findet man Leucin-Zipper in regulatorischen DNA-Bindeproteinen (1, 28), aber es gibt sie auch in Membranproteinen ohne DNA-Bindefunktion (124, 244). Computergestützte Untersuchungen an der Sekundärstruktur von ArcB bestätigen den Leucin-Zipper mit seinen konservierten Resten in Position 73, 80, 87 und 94 (68). Mutationsanalysen an den konservierten Leucinresten zeigen einzig für Leu₈₇ nach Substitution mit Alanin einen Effekt auf die Funktionalität von ArcB (146). Damit handelt es sich für die Autoren nicht um einen Leucin-Zipper im eigentlichen Sinne.

PAS-Domäne

Sequenzvergleiche zeigen, dass sich an den Leucinzipper eine sogenannte PAS-Domäne anschließt (252). Dabei ist PAS ein Akronym, geformt aus dem Namen dreier Proteine. Das für die circadiane Rhythmik in *Drosophila* verantwortliche Protein Per, der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor-Nuklear-Translokator in Vertebraten Arn_t und das *Drosophila* „Zielstrebigkeitsprotein“ Sim (161).

Die übergeordnete Faltungsstruktur PAS findet man sowohl in Bakterien als auch in Archaeen und Eukaryoten (183, 252). In Prokaryoten ist sie oft Bestandteil von Sensorkinasen. PAS bindet als Kofaktoren eine ganze Reihe kleiner Moleküle wie Häm, Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), oder das Chromophor 4-Hydroxycinnamyl (252). Damit können über PAS molekularer Sauerstoff, Redoxpotentiale oder auch Licht sensorisch erfasst werden (252).

Auch für ArcB nahm man an, dass die PAS-Domäne zur Wahrnehmung von Redoxpotentialen dient (146). Gestützt wird dies durch Transkriptionsanalysen in *arcB*-defizienten Stämmen nach Deletionen oder Substitutionen in der ArcB PAS-Domäne (118, 146). Dennoch ist die Bedeutung der PAS-Domäne zur Signalwahrnehmung umstritten. So gleichen sich ArcB Homologe aus *Salmonella typhimurium*, *Vibrio fischeri*, *Y. pestis*, *Erwinia carotovora*, und *E. coli* in ihrer Domänenstruktur vollständig, doch existiert auch ein ArcB Homolog aus *H. influenzae* (144), welchem die sensorische PAS-Domäne fehlt (144). Interessanterweise kann das Einbringen von ArcB_{*H. influenzae*} in *E. coli* Δ *arcB* den *E. coli* Wildtyp-Phänotyp unter verschiedenen Redoxbedingungen wiederherstellen (69, 144). Möglicherweise spielt die PAS-Domäne daher eher für solche Organismen eine Rolle, deren Umwelt größeren Schwankungen unterliegt als die von *H. influenzae* (69).

Signal und Signalaufnahme

Obwohl das Arc-TCS-System beim Übergang von aeroben zu anaeroben Wachstumsbedingungen progressiv aktiviert wird, konnte gezeigt werden, dass molekularer Sauerstoff nicht direkt ArcB stimuliert, sondern vielmehr der Oxidationsstatus des Chinon-Pool der Membran (143) (Abb. 8 und 10). *E. coli* synthetisiert drei Chinontypen, Ubichinon, Menachinon und Demethylchinon. Diese fungieren als Adapter verschiedener Elektronendonator- und Elektronenakzeptor-Enzymkomplexe (77, 226). Die HK ArcB reagiert dabei aber nicht auf die reduzierte Form der Chinone als Aktivierungssignal, sondern vielmehr wird ArcB durch einen oxidierten Chinonpool inaktiviert (13, 142). Zwei konservierte Cysteinreste (ArcB-PAS_{C180} und ArcB-PAS_{C241}) innerhalb der PAS-Domäne spielen bei der Stilllegung ArcBs als Kinase eine entscheidende Rolle (142).

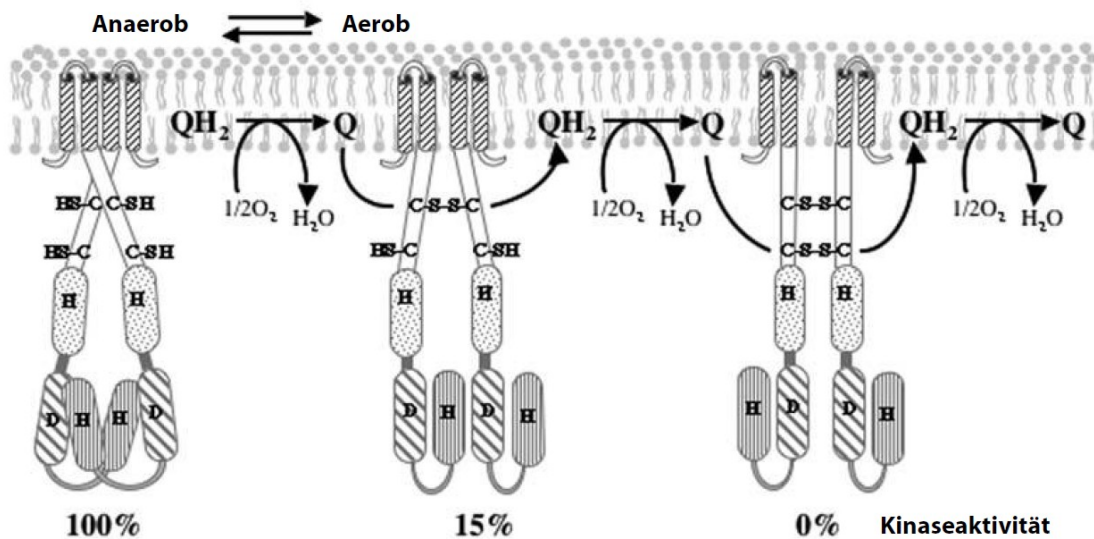


Abb.10: Mechanismus zur Inaktivierung von ArcB in *E. coli*

Der Wechsel von einer anaeroben in eine anaerobe Umgebung führt zu einer Oxidation des Chinon-Reservoirs in der Membran. Das ermöglicht einen Elektronentransfer von reduziertem ArcB-PAS_{C180} auf oxidiertes Chinon und führt zur Ausprägung einer intermolekularen Disulfidbrücke zwischen zwei ArcB-Monomeren. Diese Disulfidbrücke ihrerseits bedingt eine Rotation der beiden ArcB-Monomere zueinander und reduziert die Kinaseaktivität von ArcB um 85%. Bleibt das Chinonreservoir weiterhin oxidiert, bedingt durch einen schnellen Elektronenfluss auf Sauerstoff, wird die Bildung einer zweiten Disulfidbrücke am ArcB-PAS_{C241} induziert, die die Kinase vollständig deaktiviert.

In vivo und *in vitro* Versuche zeigen für beide Cysteinreste eine Oxidation – in Abhängigkeit zum Chinonpool der Membran – unter Bildung einer intermolekularen Disulfidbrücke zwischen zwei ArcB Monomeren (142). Das wiederum führt zu einer relativen Rotation der beiden ArcB Monomere zueinander und verhindert die Phosphorylierung der internen Rec-Domäne und somit auch von ArcA (118, 142). Die Inhibition der Kinaseaktivität ist dabei zu 85% von ArcB-PAS_{C180} und zu 15% von ArcB-PAS_{C241} abhängig (142).

4.3.4 Arc-System von *Shewanella*

Innerhalb der Gattung *Shewanella* kann ein dem *E. coli* orthologer RR ArcA leicht über Sequenzähnlichkeiten identifiziert werden. Mit 81% Identität ist ArcA eines der am höchsten konservierten Proteine zwischen *S. oneidensis* MR-1 und *E. coli* (75). In *in vivo* Experimenten konnte gezeigt werden, dass $\text{ArcA}_{E. coli}$ *S. oneidensis* MR-1 ΔarcA und $\text{ArcA}_{S. oneidensis MR-1}$ *E. coli* ΔarcA phänotypisch kreuzkomplementieren können (75). Auch besitzt $\text{ArcA}_{S. oneidensis MR-1}$ eine zu *E. coli* ArcA nahezu identische DNA-Bindestelle (67, 75). Beide Proteine gleichen sich demnach strukturell und funktionieren mechanistisch ähnlich. Darüber hinaus vermittelt ArcA *S. oneidensis* MR-1 wie auch $\text{ArcA}_{E. coli}$ eine Antwort auf den wechselnden Sauerstoffgehalt der Umwelt. So kann *S. oneidensis* MR-1 ΔarcA mit DMSO als terminalen Elektronenakzeptor nicht mehr wachsen (75, 206), aber auch unter aeroben Bedingungen ist das Wachstum einer Deletionsmutante ΔarcA gestört.

Transkriptomanalysen von ΔarcA zeigten, verglichen mit dem Wildtyp, die Regulation von mehr als 1000 Genen verändert (67). Interessanterweise ist der Überlappungsbereich der Regulons im Arc-System für *S. oneidensis* MR-1 und *E. coli* klein (67).

Innerhalb der Genome von *E. coli* und *S. oneidensis* MR-1 findet man bis zu 2183 orthologe Proteine (67). Das entspricht einem Konservierungsgrad für beide Genome von ca. 50%. Hingegen überlappen von den bis zu 50 in *S. oneidensis* MR-1 direkt durch die Arc-TCS regulierten Operons mit den 82, identifiziert in *E. coli* (67, 129), nur sechs. Über 90% der Regulation ist damit spezies-spezifisch differentiell. Es stellt sich die Frage wie die Arc-TCS trotz hoher Konservierung des RR ArcA in Anpassung an die unterschiedlichen ökologischen Nischen evolviert ist und was zu der fundamentalen Verschiebung der ArcA-DNA-Bindestellen in *Shewanella*, verglichen mit *E. coli*, geführt hat. Eine Möglichkeit besteht im Verlust oder Zugewinn regulatorischer Komponenten und der daraus resultierenden veränderten Architektur und Dynamik im bestehenden TCS-System (Abb. 5 und 8).

Im Falle des *Shewanella* Arc-Systems kann man im Gegensatz zu ArcA eine korrespondierende Sensorkinase ArcB über Sequenzvergleiche nicht identifizieren. Nur eine Hpt HptA zeigt signifikante Homologien zum C-Terminus von *E. coli* ArcB (75). Genetische Studien implizieren eine Verbindung beider Proteine im selben TCS-System doch bleibt die Frage nach der korrespondierenden Kinase zu ArcA in diesem atypischen Arc-System weiterhin unbeantwortet.

5 Ergebnisse

5.1 Arc-System von *Shewanella oneidensis* MR-1

5.1.1 SO_0577 – Eine mögliche Sensorkinase zu ArcA

Das Genom von *S. oneidensis* MR-1 kodiert für 44 putative Histidinkinasen (HK) darunter neun Hybride als mögliche Interaktionspartner von ArcA (81). Um die Anzahl möglicher Kandidaten zu reduzieren legte ich folgende sechs Kriterien fest.

1. Bioinformatische Vergleiche von *E. coli* *arcB*/ArcB mit dem *S. oneidensis* MR-1 Genom/Proteom führten zu keinem eindeutigen Ergebnis in Bezug auf Domänenstruktur oder Sequenzähnlichkeit. Andere orthologe HKs wie z.B. EnvZ oder BarA lassen sich in *S. oneidensis* MR-1 hingegen leicht identifizieren. Somit können annotierte Gene/Proteine bei einer ersten Suche außer Acht gelassen werden.
2. In orthologen Arc-Systemen ist die korrespondierende Kinase zu ArcA nie orthodox sondern stets ein Hybrid. Die Phosphogruppe wird dabei in einem Multischritt-Phosphorelaisystem auf ArcA transferiert. Es ist gut vorstellbar, dass gleiches auch für *S. oneidensis* MR-1 zutrifft.
3. Die Anwesenheit der Histidin-Phosphotransferase (Hpt) HptA in *S. oneidensis* MR-1 als Interaktionspartner von ArcA unterstützt die Vorstellung eines solchen komplexen Multischritt-Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssystems (Multischritt-TCS-System) und macht darüber hinaus das Vorhandensein einer Hpt-Domäne als integralen Bestandteil des putativen Hybriden überflüssig.
4. Sowohl der Antwortregulator (RR) ArcA als auch die Hpt HptA sind innerhalb des Genus *Shewanella* hochkonserviert. Der gleiche Grad an Konservierung trifft vermutlich auch auf die gesuchte Sensorkinase zu.
5. Ebenso wie in *E. coli* steuert das Arc-System in *S. oneidensis* MR-1 die Genexpression in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt der Umgebung. Dabei spielt in *E. coli* die ArcB-PAS-Domäne eine entscheidende Rolle. Für das *S. oneidensis* MR-1 Arc-System ist daher eine HK mit PAS-Sensorik ebenso gut vorstellbar.
6. Werden Kinasen mit einem Antwortregulator als transkriptionale Einheit kodiert, so sind sie meist auch Interaktionspartner im gleichen TCS-System. Im Gegensatz dazu werden der RR ArcA sowie die Hpt HptA genetisch isoliert von anderen TCS-Proteinen kodiert. Ausgehend davon kann man hypothesisieren, dass dies auch für die gesuchte Sensorkinase im *S. oneidensis* MR-1 Arc-System zutrifft.

Legt man alle Annahmen zu Grunde, so ist die Hybrid-HK SO_0577 (Abb. 11 und 13) der wahrscheinlichste Kandidat für die bis jetzt unbekannte korrespondierende Sensorkinase zu ArcA in *S. oneidensis* MR-1.

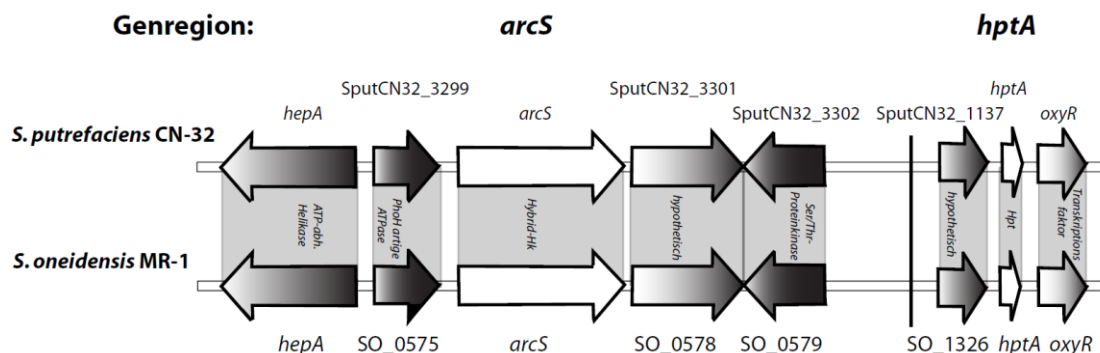


Tabelle 3: Orthologe Proteine zu ArcS innerhalb des Genus *Shewanella*

Spezies	ArcS		HptA	
	Identität/ Ähnlichkeit	Lokusname	Identität/ Ähnlichkeit	Lokusname
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	100/100	SO_0577	100/100	SO_1327
<i>Shewanella</i> sp. MR-7	98/99	ShewMR7_3453	97/99	ShewMR7_2951
<i>Shewanella</i> sp. MR-4	98/99	ShewMR4_0577	97/99	ShewMR4_2826
<i>Shewanella</i> sp. ANA-3	98/99	Shewana3_0576	95/98	Shewana3_3047
<i>Shewanella baltica</i> OS223	94/97	Sbal223_3731	88/94	Sbal223_3133
<i>Shewanella baltica</i> OS185	94/97	Shew185_3788	88/94	Shew185_1224
<i>Shewanella baltica</i> OS195	94/97	Sbal195_3914	88/94	Sbal195_1257
<i>Shewanella baltica</i> OS155	94/97	Sbal_0537	88/94	Sbal_1180
<i>Shewanella</i> sp. W3-18-1	94/97	SputW3181_0641	89/91	SputW3181_3026
<i>Shewanella putrefaciens</i> CN-32	94/97	SputCN32_3300	89/91	Sputcn32_1138
<i>Shewanella putrefaciens</i> 200	94/97	Sput200_2419	89/91	Sput200_3565
<i>Shewanella sediminis</i> HAW-EB3	84/92	Ssed_0627	82/88	Ssed_1128
<i>Shewanella loihica</i> PV-4	83/92	Shew_0459	83/88	Shew_1034

5.1.3 Offener Leserahmen von *arcS*

Zur Überprüfung der Richtigkeit des ORF von *arcS* wurden die putativen aa-Sequenzen aller orthologen Proteine zu ArcS gegeneinander abgeglichen (Abb. 12). Dabei stellte sich das für *S. oneidensis* MR-1 annotierte Startmethionin als nicht konserviert heraus. In sechs aus 21 für die Analyse herangezogenen Stämmen wurde es mit einem Leucin, Isoleucin oder Valin substituiert (Abb. 12). Darüber hinaus offenbarte eine Translation der stromaufwärts des putativen Starts gelegenen Sequenz bei *S. woodyi* ATCC 51908, *S. halifaxensis* HAW-EB4 und *S. sediminis* HAW-EB3 die zweite TM-Domäne. Der annotierte ORF konnte somit auch für diese Stämme um 48 aa vergrößert werden. Im Falle von *S. oneidensis* MR-1 konnte bei einer Übersetzung von Nukleotid- in aa-Sequenz stromaufwärts des annotierten Startkodons die TM-Domäne bis zu einem konservierten Phenylalanin nachvollzogen werden (Abb. 12). Danach weicht die aa-Sequenz von ArcS grundlegend von allen anderen untersuchten Stämmen ab. Grund hierfür könnte eine Verschiebung des Leserasters in der Nukleotidsequenz sein. Zur Überprüfung der annotierten Nukleotidsequenz wurde *arcS* selbst sowie jeweils 500 bp stromauf- und abwärts mehrfach nachsequenziert. Unsere Sequenzierung ergab einen Fehler in der annotierten Version von *arcS*. So wurden anstelle einer Folge von sechs Thymidinresten nur fünf annotiert (Abb. 12). Legt man diese korrigierte Sequenz zu Grunde und übersetzt erneut stromaufwärts des annotierten Startmethionins, so erhält man nun auch für *arcS* die zweite TM-Domäne. Mehr noch, das neu annotierte Startkodon zeigt sich nun im gesamten Genus *Shewanella* als konserviert. Auch die ORF-Prediktions-Software EasyGene (<http://www.cbs.dtu.dk/services/EasyGene/>) sagt nach Eingabe der korrigierten Sequenz den neuen Leserahmen für ArcS voraus.

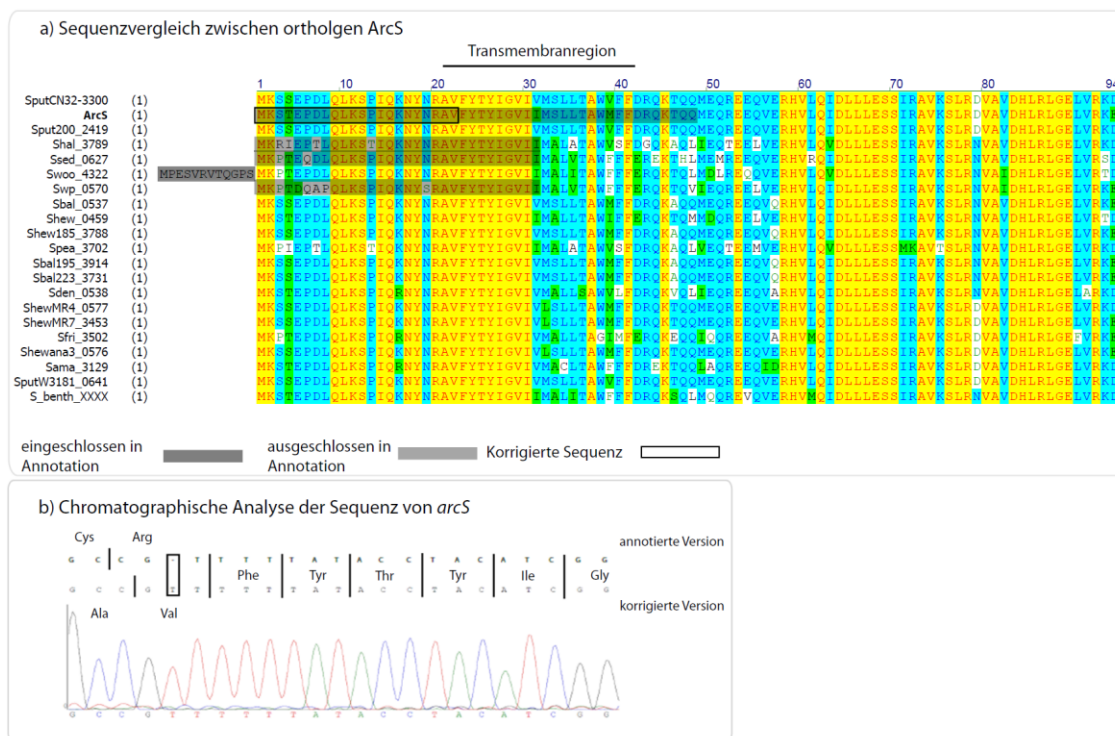


Abb.12: Die Korrektur des Leserahmens von arcS

a) Nach Translation der stromaufwärts des Startkodons gelegenen Bereiche ließ sich bei *S. woodii* ATCC 51908, *S. halifaxensis* HAW-EB4, *S. sediminis* HAW-EB3 und nach Korrektur des Leserahmens auch bei *S. oneidensis* MR-1 eine zweite TM-Domäne identifizieren. Sie ist wie auch der konservierte Start integraler Bestandteil aller orthologen Proteine zu ArcS. b) Die chromatografische Analyse der genetischen Umgebung von arcS zeigt eine Folge von sechs Thyminidresten an Stelle der annotierten fünf.

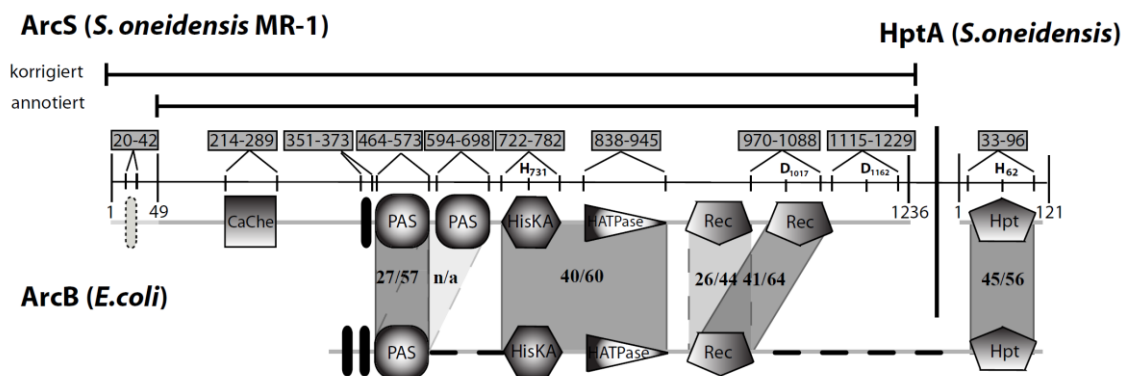


Abb.13: Domänenorganisation von ArcS, HptA und ArcB

ArcS weist verglichen mit *E. coli* ArcB fundamentale Unterschiede in seiner Domänenstruktur auf. So verfügt ArcS mit einer CaChe-Domäne und einer zusätzlichen PAS-Domäne nicht nur über eine erweiterte Sensorik verglichen mit ArcB, sondern mit einer zusätzlichen Rec-Domäne im katalytischen Bereich auch über mehr regulatorisches Potential. Die Position konservierter Aminosäuren mit vermuteter Funktion im Phosphogruppentransfer ist innerhalb der Domäne gesondert gekennzeichnet. Graue Bereiche decken analoge Domänen ab und geben anhand der Graustufe Auskunft über die Ähnlichkeit. Die Zahlen innerhalb der grauen Bereiche stehen für Identität/Ähnlichkeit. Annotierte und korrigierte Version von ArcS sind durch schwarze Balken und gesondert dargestellte Domänen sichtbar gemacht.

Der korrigierte ORF von *arcS* umfasst 3.601 bp und kodiert für ein – verglichen mit der annotierten Version – um 48 aa verlängertes Protein. Damit ist ArcS 1.236 aa lang und 140,5 kDa schwer. Die zusätzliche TM-Domäne orientiert nun nicht mehr nur den Carboxyterminus im Zytoplasma sondern auch den Aminoterminus (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>). Als Konsequenz der Korrektur werden alle weiteren Versuche, die ein vollständiges Protein erfordern, mit der korrigierten Version von *arcS*/ArcS durchgeführt.

5.1.4 Phänotypische Analyse von *S. oneidensis* MR-1 *arc*-Deletionsmutanten

Zur Beantwortung der Frage, ob ArcS, HptA und ArcA im gleichen TCS-Weg zusammenarbeiten, wurden *S. oneidensis* MR-1 Stämme mit Deletionen im Arc-System phänotypisch untereinander und mit dem Wildtyp verglichen. In einem ersten Schritt fertigte ich in Frame Deletionen in *arcS*, *hptA* und *arcA* an. Dabei entstanden sowohl die Stämme mit Einzeldelationen $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$, als auch alle möglichen Kombinationen an Doppeldeletionen $\Delta arcS/\Delta hptA$, $\Delta arcS/\Delta arcA$, $\Delta hptA/\Delta arcA$, sowie die Tripledeletion $\Delta arcS/\Delta hptA/\Delta arcA$. Im Rahmen der Konstruktion dieser Stämme erwies sich der Suizidvektors pGP704*Sac*28Km als ungenügend und es war nötig einen Alternativektor zu generieren.

Die Konstruktion von pNPTS138-R6KT

Bei pGP704*Sac*28Km (Abb.14) handelt es sich durch den Replikationsursprung γ (γ ori) in *Shewanella* sp. um einen Suizidvektor. Der Vektor kodiert eine Neomycin-Phosphotransferase (Npt) sowie eine Levan-Synthase (SacB) und ermöglicht so die Vorwärtsselektion auf homologe Rekombinationsereignisse in *Shewanella* Spezies. Der Transfer von pGP704*Sac*28Km erfolgt aufgrund geringer Transformationseffizienzen durch Konjugation. Zusammengenommen ermöglicht der Einsatz von pGP704*Sac*28Km eine effektive Deletion von Genen in verschiedenen *Shewanella* Spezies. Jedoch ist die multiple Klonierungsstelle (MCS) auf vier Restriktionsendonukleasen reduziert. Darüber hinaus ist die genaue Sequenz des Plasmids unbekannt und es existieren keine Primer zur vollständigen Sequenzierung inserierter Fragmente.

Durch Austausch des Replikationsursprungs pUC-ori aus pNPTS138 (M.R. Alley unveröffentlicht) mit einem γ ori erhielt ich pNPTS138-R6KT (Abb. 14). Dazu wurde in einem ersten Schritt der γ ori aus pUC-18R6KT-mini-Tn7T amplifiziert. In einem zweiten Schritt ligierte ich diesen dann über kompatible kohäsive Enden (*Bss*SI/*Dra*III) in den replikationsursprungslosen pNPTS138. Der entstandene Vektor pNPTS138-R6KT verfügt über die gleichen genetischen Elemente wie pGP704*Sac*28Km und kann diesen vollständig ersetzen. Zudem erleichtert die erweiterte MCS mit jetzt 14 Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen künftige Klonierungen. Die vektoriell integrierten Sequenzen der Primer M13uni und M13Rev machen Zwischenklonierungen in Klonierungsvektoren überflüssig. Das in die MCS eingebaute Gen zur Produktion der β -Galaktosidase α -Untereinheit erlaubt

darüber hinaus die Blau/Weiß-Selektion und so die visuelle Detektion in den Vektor integrierter Fragmente.

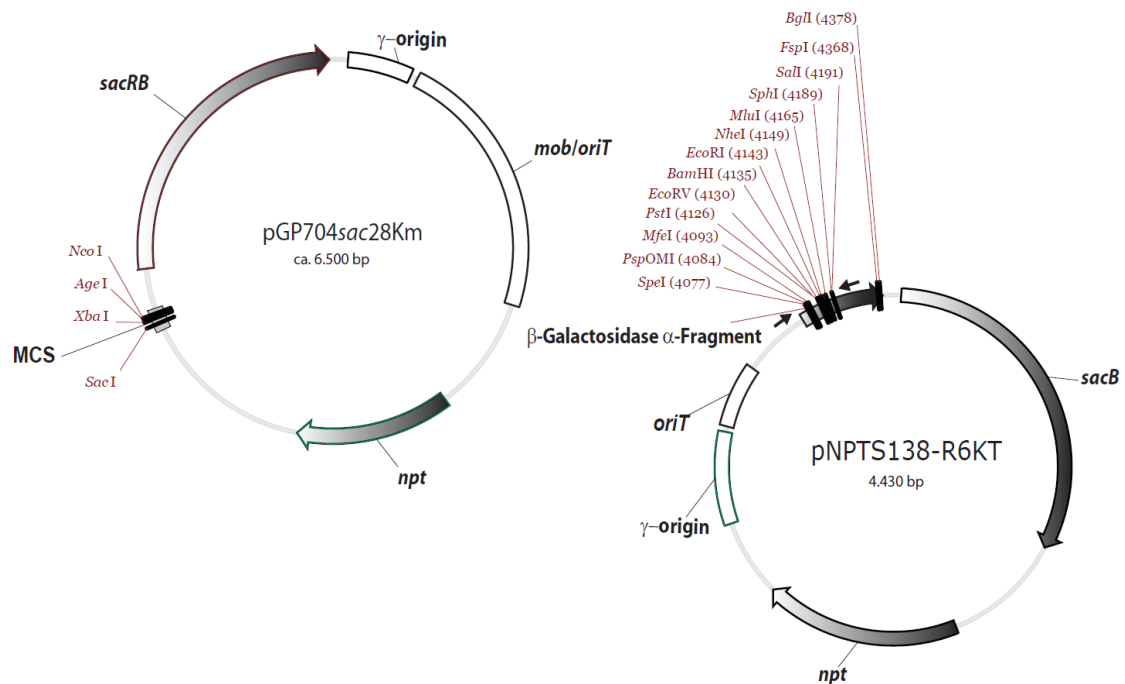


Abb.14: Die Suizidvektoren pGP704Sac28Km und pNPTS138R6KT im Vergleich

pGP704Sac28Km (links) mit unbekannter Sequenz kodiert für eine Kanamycinresistenz (*npt*), eine Levansynthase (*sacB*) einen Transferursprung (*oriT*), einen Replikationsursprung γ (γ -origin) und eine multiple Klonierungsstelle (MCS) mit Schnittstellen für vier Restriktionsendonukleasen. pNPTS138-R6KT (rechts) besitzt eine bekannte Sequenz von 4.430 bp Länge und vermittelt die gleichen Funktionen wie pGP704Sac28Km. Im Gegensatz zu diesem ist die MCS bei pNPTS138-R6KT auf 14 Schnittstellen für vier Restriktionsendonukleasen vergrößert. Vektorinterne Sequenzen handelsüblicher Sequenzierprimer (schwarze Pfeile) sowie die Möglichkeit zur Blau/Weiß-Selektion erleichtern die Klonierung und Überprüfung von Insertionsfragmenten.

Deletionen im Arc-System von *S. oneidensis* MR-1 haben pleiotrope Auswirkungen

Über *S. oneidensis* MR-1 Stämme mit Deletionen in *hptA* und *arcA* sind pleiotrope Effekte beschrieben. Verglichen mit dem Wildtyp verhalten sich die Mutationen unter aeroben Bedingungen sowie unter anaeroben Bedingungen mit DMSO als terminalen Elektronenakzeptor wachstumsdefizient (67, 75, 206). Ebenso sind $\Delta arcA$ Stämme in Bezug auf Biofilmbildung und Biofilmdynamik gegenüber dem Wildtyp beeinträchtigt (223). Ein vergleichbarer pleiotroper Phänotyp von $\Delta arcS$ wäre ein deutlicher Hinweis für das Wirken von ArcS im selben TCS-System wie ArcA und HptA. In Anlehnung an die für $\Delta arcA$ und $\Delta hptA$ beschriebenen Effekte untersuchte ich das Wachstum, die Genexpression, die Motilität und die Biofilmbildung von $\Delta arcS$.

Aerobes und anaerobes Wachstum werden von ArcS, HptA und ArcA beeinflusst

Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten lehnte ich die Wachstumsversuchsführung an die vorausgegangener Studien an. Einzeldelationen in *arcS* und *hptA* sowie die Doppeldeletion $\Delta arcS/\Delta hptA$ verlangsamten das aerobe Wachstum in LB (Abb. 15) von 42 min je Verdopplung im Wildtyp auf 55 min (Einzeldelationsstämmen) bzw. 54,3 min (Doppeldeletion). Deletionen in *arcA* erhöhten die Verdopplungszeit weiter auf 64,5 min ($\Delta arcA$) und verhielten sich damit identisch zu den Doppeldeletionsstämmen $\Delta arcS/\Delta arcA$ (64,9 min) und $\Delta hptA/\Delta arcA$ (64,4 min) sowie dem Tripledeletionsstamm $\Delta arcS/\Delta hptA/\Delta arcA$ (66,7 min).

Kultiviert man $\Delta hptA$ oder $\Delta arcA$ anaerob in LB zeigen die Stämme in Abhängigkeit vom terminalen Elektronenakzeptor ein unterschiedliches Wachstumsverhalten bezogen auf den Wildtyp (75). In Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten verhielten sich $\Delta arcA$ und $\Delta hptA$ mit Fumarat als terminaler Elektronenakzeptor im Wachstum identisch zum Wildtyp (Abb. 15). Der gleiche Phänotyp konnte bei $\Delta arcS$ beobachtet werden. Setzte man als terminalen Elektronenakzeptor DMSO hinzu so erhöhte sich die Verdopplungszeit von 73,7 min im Wildtyp auf 94,4 min bei $\Delta arcS$ und 93,3 min bei $\Delta hptA$. Noch drastischer fiel der Wachstumsdefekt bei $\Delta arcA$ aus. Bei einer $OD_{600\text{ nm}} \approx 0,2$ stellte dieser Stamm genau wie die Negativkontrolle (Wildtypwachstum in LB ohne Zugabe eines terminalen Elektronenakzeptors) das Wachstum ein (Daten nicht gezeigt).

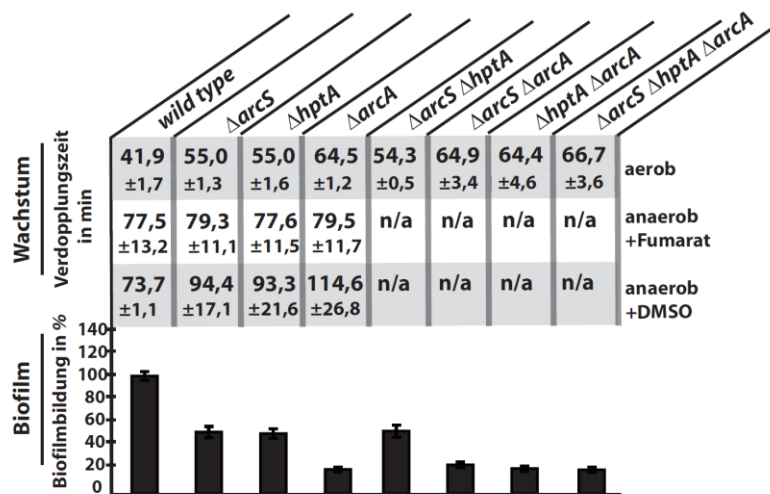


Abb.15: Wachstum und Biofilmbildung von *S. oneidensis* MR-1.

Oben: Gezeigt ist das Wachstum in LB als Verdopplungszeit in der logarithmischen Phase in aerober und anaerober Kultur mit Fumarat oder DMSO als terminalen Elektronenakzeptor. Unter aeroben Bedingungen sowie anaerob mit Zusatz von DMSO verhalten sich Stämme mit Deletionen von Genen im Arc-System wachstumsdefizient verglichen mit dem Wildtyp. Dabei ist die Verdopplungszeit von $\Delta arcA$ stets höher als bei $\Delta arcS$ und $\Delta hptA$. Deletiert man gleichzeitig zwei oder drei Gene des Arc-Systems, so sind die Effekte auf das Wachstum nie kumulativ. Unten: Gezeigt ist die quantitative Auswertung von Biofilmbildung im Mikrotiterplattenformat. Ähnlich wie beim Wachstum ist die Biofilmbildung verglichen mit dem Wildtyp in $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$ sowie den korrespondierenden Doppel- und Tripledeletionsstämmen gestört und genau wie beim Wachstum treten durch Deletion von mehr als einem Gen keine kumulativen Effekte auf.

Um auszuschließen, dass die beobachteten Phänotypen durch ungewollte Nebeneffekte hervorgerufen werden, wurde die Expression des betroffenen Gens im Arc-System zum einen ektopisch vom Plasmid pBAD33 induziert. Zum anderen erfolgte die Wiedereinführung einer Wildtypkopie des Gens in den Locus der Deletion („Knock-In“). Sowohl die Knock-In-Stämme als auch die Komplementationsplasmid-tragenden Deletionen $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$ verhielten sich (nach Induktion) im aeroben Wachstum vergleichbar zu dem des Wildtyps (Abb.16).

		wild type	$\Delta arcS$	KI- $arcS$	$\Delta hptA$	KI- $hptA$	$\Delta arcA$	KI- $arcA$		
		41,9 ±1,7	55,0 ±1,3	41,8 ±2,7	55,0 ±1,6	44,1 ±2,0	64,5 ±1,2	44,4 ±0,7		
Wachstum	Verdopplungszeit in min	56,6 ±1,2	73,4 ±3,5	n/a	70,9 ±4,0	n/a	88,7 ±5,6	n/a	still	+pBAD33
		57,6 ±0,9	72,2 ±3,5	n/a	72,9 ±2,6	n/a	87,9 ±5,8	n/a	induziert	
		n/a	70,5 ±2,4	n/a	67,2 ±3,1	n/a	65,3 ±2,0	n/a	still	
		n/a	61,9 ±1,4	n/a	63,2 ±2,9	n/a	64,0 ±1,8	n/a	induziert	
		+ pBAD33- $arcS$		+ pBAD33- $hptA$		+ pBAD33- $arcA$				

Abb.16: **Komplementation des aeroben Wachstums von *S. oneidensis* MR-1 $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$**

Gezeigt ist das Wachstum in LB als Verdopplungszeit in der logarithmischen Phase bei aerober Kultivierung. Sowohl durch Wiederherstellung des Wildtypgenotyps (oben), als auch durch ektopische Expression von *arcS*, *hptA* und *arcA* (unten) ließ sich eine dem Wildtyp vergleichbare Verdopplungszeit erreichen. Um das Plasmid pBAD33 in *S. oneidensis* MR-1 stabil zu halten erfolgte die Zugabe von Chloramphenicol (Cm) ins Medium. Effekte auf das Wachstum bedingt durch Antibiotikum (Cm), den Induktor (Arabinose) oder das Plasmid (pBAD33) als solches wurden durch Aufnahme einer Wachstumskinetik für alle untersuchten Stämme mit dem Leerplasmid unter Zugabe von Antibiotikum und Induktor herausgenommen (Mitte).

Effekte auf das Wachstum einer Zelle können vielfältigen Ursprungs sein. So ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht auszuschließen, dass die Folgen für das Wachstum von *S. oneidensis* MR-1 resultierend aus den Deletionen in *arcS*, *hptA* und *arcA* polykausalen Ursprungs sind. Sollten aber ArcS, HptA und ArcA gleiche Gene in ihrer Expression beeinflussen, so ist anzunehmen, dass auch die Wachstumsphänotypen auf ein und dasselbe TCS-System zurückzuführen sind.

Transkriptomanalysen von $\Delta arcA$ zeigten die Beeinflussung der Expression von mehr als 1000 Genen in Abhängigkeit von gelöstem Sauerstoff (67). Daten über das Transkriptom von $\Delta arcS$ könnten Auskunft darüber geben, inwieweit ArcS zum einen die Transkription allgemein beeinflusst und ob es sich überhaupt als Bestandteil eines globalen Regulationssystems erweist. Zum anderen könnten anhand des Überlappungsgrades beider Regulons, Rückschlüsse auf mögliche Interaktionen gezogen werden.

ArcS beeinflusst unter aeroben Bedingungen die Regulation von mehr als 500 Genen

Während des logarithmischen Wachstums in LB unter aeroben Bedingungen unterscheiden sich die Verdopplungszeiten von $\Delta arcS$ und Wildtyp deutlich. Dieser Zeitpunkt schien mir daher besonders geeignet, um Unterschiede zwischen beiden Transkriptomten zu detektieren. Ich erntete daher Zellen des Wildtyps und der Mutante $\Delta arcS$ eine Stunde nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase bei einer $OD_{600\text{ nm}} = \sim 0,5$ als biologisches Triplikat. Die Transkriptomanalyse erfolgte kommerziell durch die Fa. Febit Biomed GmbH (Heidelberg).

Transkriptomdatensätze von *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp und $\Delta arcS$ wurden statistisch ausgewertet (Material und Methoden). Die Genregulation wurde als signifikant angenommen, wenn der p-Wert $< 0,05$ war. Unterschieden sich Gene aus Wildtyp und $\Delta arcS$ darüber hinaus in ihrer Expression um mehr als Faktor 2, bezog ich sie in die weiteren Untersuchungen mit ein. Die Validierung der statistischen Signifikanz erfolgte durch Überprüfung des Expressionsverhaltens von $\Delta arcS$ bezogen auf den Wildtyp in einer quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR) (Abb. 17). Sieben ausgewählte Gene wurden dabei überprüft und zu den Microarray-Daten in Beziehung gesetzt. Das Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,94$ steht für die Validität der Transkriptomdaten und zeigt deutlich, wie gut die ermittelte Genregulation durch den Microarray mit der ermittelten Regulation aus der qRT-PCR übereinstimmt.

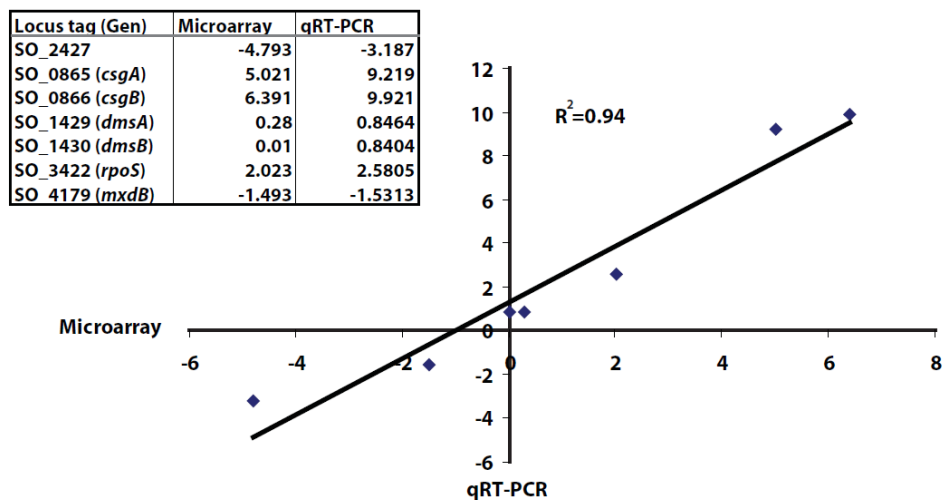


Abb.17: Validierung der Transkriptomanalysen durch qRT-PCR.

Im Diagramm sind die \log_2 -fachen Veränderungen der Expression von $\Delta arcS$ bezogen auf den Wildtyp dargestellt. Die Abszisse zeigt dabei die Daten ermittelt aus dem Microarray, die Ordinate die ermittelten Daten aus der qRT-PCR. Aus den korrespondierenden Punkten wurde eine lineare Regressionsgerade berechnet. Der Determinationskoeffizient $R^2 = 0,94$ zeigt die statistische Varianz der Daten.

ArcS beeinflusst unter aeroben Bedingungen die Expression von 604 Genen. Davon werden bezogen auf den Wildtyp 295 Gene positiv und 309 Gene negativ reguliert (Abb. 18; Anhang 1). Die größte Gruppe stellen mit 37% Gene, die hypothetische Proteine kodieren. Mit 28% repräsentieren Gene, deren korrespondierende Proteine Funktionen im Metabolismus übernehmen, die zweitgrößte Gruppe. Wie in $\Delta arcA$ (67) sind innerhalb dieser Gruppe keine Gene zu finden, die für Enzyme der Glykolyse oder des Krebszyklus kodieren (Anhang 1). Dafür aber ist die Expression von Genen, die für Enzyme mit

einer Rolle im Glyoxalatzyklus – wie die Isocitratlyase AceB (Faktor: 3,6) und die Malatsynthase AceA (Faktor: 3,5) – und im anaeroben Stoffwechsel – wie der Fumaratreduktasekomplex (Faktor: ~2) und die Nitratreduktase NapA (Faktor: 3,5) – kodieren, deutlich erhöht. In die Gruppe des Metabolismus fällt auch SO_3099, ein Protein, welches putativ langkettige Fettsäuren transportiert und innerhalb des Genus *Shewanella* hochkonserviert ist. Mit Faktor ~84 ist es das am stärksten negativ regulierte Gen.

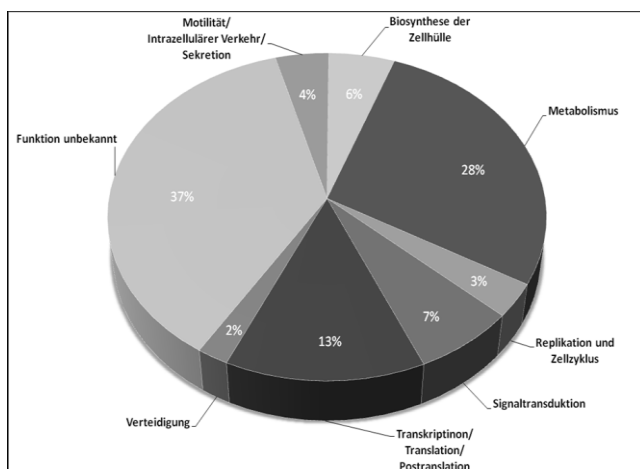
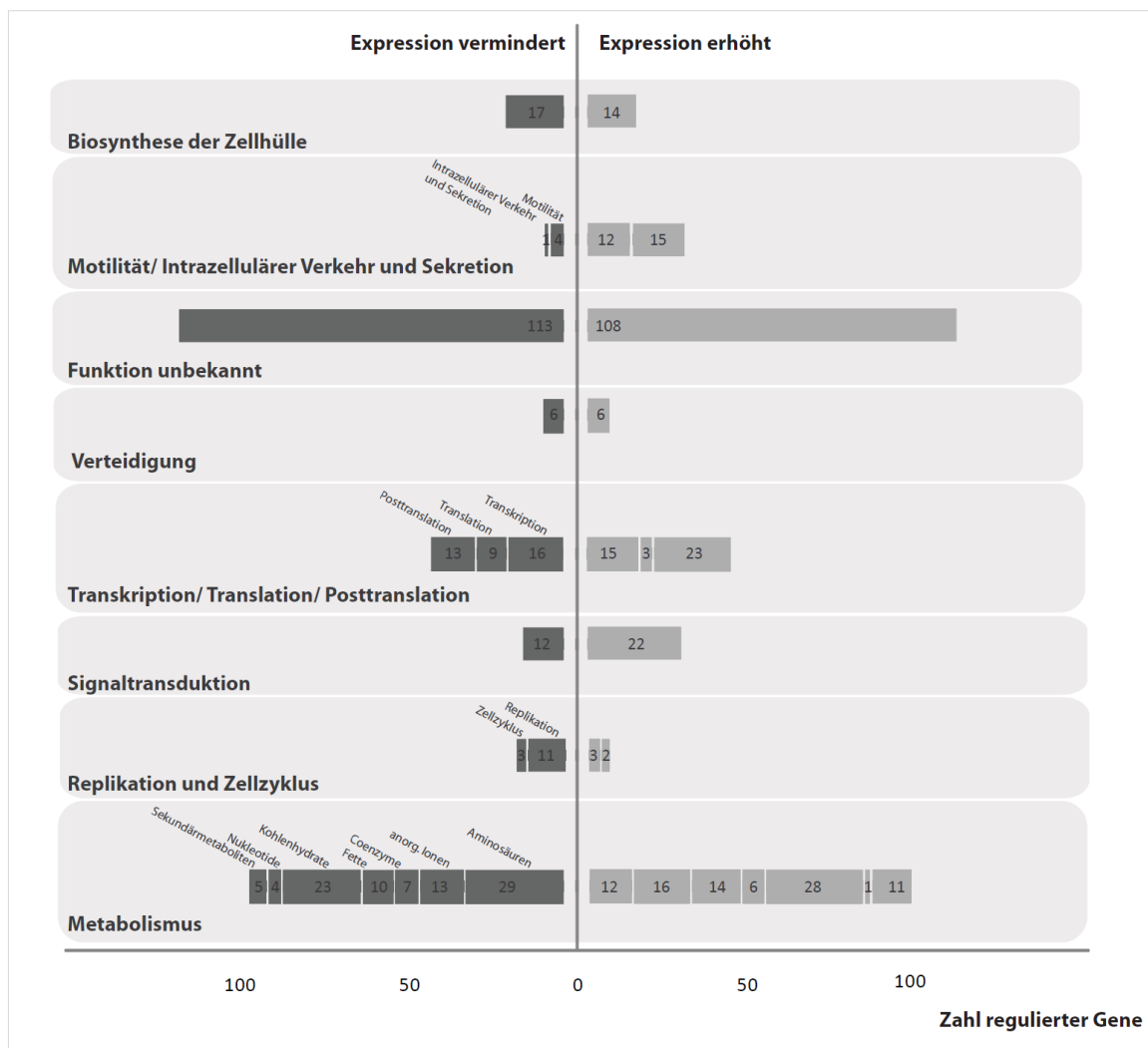


Abb.18: Das Transkriptom von $\Delta arcS$

Das Transkriptom von $\Delta arcS$ relativ zum Transkriptom des Wildtyps zeigt eine veränderte Expression für 604 Gene. Damit ist ArcS ebenso wie ArcA Bestandteil eines globalen TCS-Systems. Oben: Dargestellt ist die Expression der durch ArcS beeinflussten Gene bezogen auf den Wildtyp. Dabei zeigt die linke Hälfte alle negativ regulierten Gene; die rechte Hälfte alle positiv regulierten Gene. Die für links angefertigte Beschriftung trifft in gespiegelter Form auch für die rechte Seite zu. In den einzelnen Kategorien (graue Kästen) ist die Zahl der betroffenen Gene gesondert aufgeführt. Unten: Das Kreisdiagramm zeigt die relative Verteilung regulierter Gene nach funktionalen Kategorien in %.

Bei der Regulation der Zellhüllbiosynthese (6%), zu denen ich auch die Zellanhänge gerechnet habe, sind Curli (65) in $\Delta arcS$ am stärksten reguliert. So sind die Strukturgene der Curli *csgAB* um Faktor ~52 gegenüber dem Wildtyp überexprimiert. Das System für den Transport der Curli über die äußere Membran *csgEFG* ist um Faktor ~5 positiv reguliert (Abb. 35).

Mit 7% (34 Gene) beeinflusst ArcS auch deutlich Signalaufnahme und -weiterleitung anderer Regulationssysteme, darunter allein sieben Methylakzeptierende Chemotaxisproteine (MCP), die z.T. um mehr als Faktor 10 reguliert sind (SO_4557: 13,1fach). Ebenso ist die Expression von sechs Genen, die GGDEF-Domänenproteine kodieren, beeinflusst. Dazu gehören z.B. das spezie-spezifische Ein-Komponenten-Signaltransduktions-Protein (OCS-Protein) SO_3489 (Faktor: 8,4) und das konservierte OCS-Protein SO_0569 (Faktor: 2,4).

Die Transkriptomanalysen von $\Delta arcS$ zeichnen das Bild einer Kinase als Bestandteil eines globalen Regulationssystems wie Arc. Doch inwieweit überlappen die Regulons von ArcS und ArcA, und lassen sich anhand des Überlappungsgrades Rückschlüsse auf ein Zusammenwirken von ArcS und ArcA in ein und demselben TCS-System ziehen? Zur Beantwortung dieser Fragen verglich ich die Transkriptome von $\Delta arcS$ und $\Delta arcA$.

Das Regulon von ArcS überlappt mit dem Regulon von ArcA zu 85,9%

Gao *et al.* veröffentlichten 2008 die Transkriptome von *S. oneidensis* MR-1 $\Delta arcA$ in Abhängigkeit von Sauerstoff. Darunter war auch ein Transkriptom logarithmisch aerob wachsender Zellen. Diese Bedingungen entsprachen genau jenen, unter denen ich das Transkriptom von $\Delta arcS$ untersuchte. Aus beiden Datensätzen wurden 425 Gene mit signifikanter Regulation extrahiert. Davon zeigten 365 Gene (85,9%) die gleiche Tendenz (Abb. 19a). Das Transkriptom von $\Delta arcS$ deckt sich somit sehr gut mit dem von $\Delta arcA$. Darüber hinaus stimmen die 20 am stärksten regulierten Gene zusätzlich auch im Grad überein (Abb. 19a).

Um weiter zu bestimmen, ob die Regulons von ArcS und ArcA auch unter anaeroben Kultivierungsbedingungen übereinstimmen, ermittelte ich durch qRT-PCR die Genexpression von fünf ausgewählten Genen (*csgB*, *rpoS*, *aggA*, und *dmsB*) sowohl aerob wachsender *S. oneidensis* MR-1 Kulturen als auch anaerob wachsender Kulturen mit Fumarat oder DMSO als terminalen Elektronenakzeptor (Abb. 19b). Hierbei bezog ich in meine Betrachtung nicht nur $\Delta arcS$ und $\Delta arcA$ sondern auch $\Delta hptA$ mit ein. Wie schon beim Wachstum verhielten sich auch in der Genexpression $\Delta arcS$ und $\Delta hptA$ vergleichbar, während $\Delta arcA$ zwar tendenziell mit der Genexpression von $\Delta arcS$ und $\Delta hptA$ übereinstimmte, graduell jedoch abwich. So war die Expression der Gene in $\Delta arcA$ um bis zu 20fach (*csgB*) stärker betroffen als in $\Delta arcS$ und $\Delta hptA$.

Die deckungsgleichen Regulons von $\Delta arcS$ und $\Delta arcA$, sowie die vergleichbaren Effekte auf Wachstum und Genexpression unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen für $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$ sind deutliche Hinweise auf ein funktionales Arc-System in *S. oneidensis* MR-1 bestehend aus ArcS, HptA und ArcA. Die Einblicke in das Transkriptom von $\Delta arcS$ und $\Delta arcA$ lassen darüber hinaus

weitergehende Schlüsse zu, welche Verhaltensweisen neben dem Wachstum beeinflusst werden und liefern mögliche Erklärungen, welche Proteine bereits bekannte Veränderungen zum Wildtypphänotyp z.B. während der Biofilmbildung vermitteln

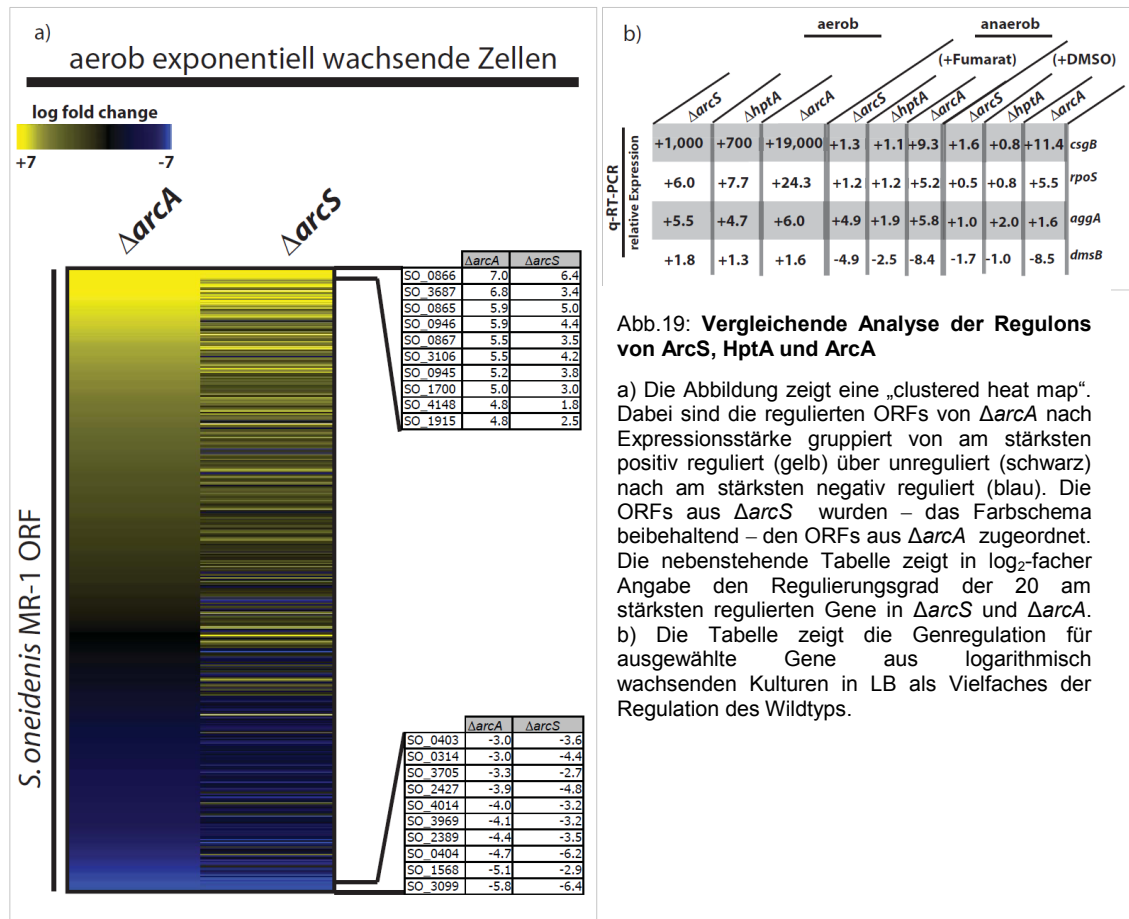


Abb.19: Vergleichende Analyse der Regulons von ArcS, HptA und ArcA

a) Die Abbildung zeigt eine „clustered heat map“. Dabei sind die regulierten ORFs von $\Delta arcA$ nach Expressionsstärke gruppiert von am stärksten positiv reguliert (gelb) über unreguliert (schwarz) nach am stärksten negativ reguliert (blau). Die ORFs aus $\Delta arcS$ wurden – das Farbschema beibehaltend – den ORFs aus $\Delta arcA$ zugeordnet. Die nebenstehende Tabelle zeigt in \log_2 -facher Angabe den Regulierungsgrad der 20 am stärksten regulierten Gene in $\Delta arcS$ und $\Delta arcA$. b) Die Tabelle zeigt die Genregulation für ausgewählte Gene aus logarithmisch wachsenden Kulturen in LB als Vielfaches der Regulation des Wildtyps.

Die Motilität wird von ArcS, HptA und ArcA beeinflusst

Die Transkriptomanalyse von $\Delta arcS$ zeigte, dass die Expression von 16 Genen, deren Proteine mögliche Funktionen im Bereich Motilität haben, reguliert wird (Abb. 18). Dabei bleibt die Biosynthese der Flagelle zwar unbeeinflusst, dennoch kann z.B. ein Defekt im chemotaktischen System durchaus Veränderungen im Schwimmverhalten nach sich ziehen. Um zu bestimmen, ob das *Shewanella* Arc-System an der Regulation des Schwimmverhaltens von *S. oneidensis* MR-1 beteiligt ist, tropfte ich logarithmisch wachsende Zellen des Wildtyps und der Stämme $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$ auf LB-Weichagarplatten, inkubierte diese für 24h bei 30°C und analysierte die Platten auf Effekte im Schwimmen (Abb. 20). Der Durchmesser der *S. oneidensis* MR-1 Kolonie auf einer Platte ist hierbei direktes Maß für die Schwimffähigkeit der Zellen.

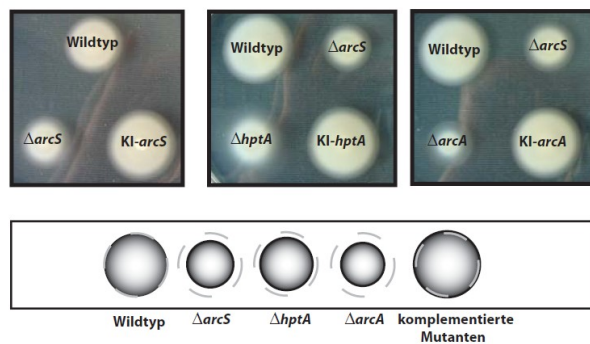


Abb.20: Vergleichende Analyse des Schwimmverhaltens von Stämmen mit Deletionen im Arc-System

Die Abbildung zeigt das Schwimmverhalten von *S. oneidensis* MR-1. Der Koloniedurchmesser ist dabei ein direktes Maß für die Fähigkeit zu schwimmen. Oben: die Fotos zeigen Ausschnitte einer Platte mit Wildtyp als Kontrolle für normales Schwimmverhalten sowie die Einzeldelationen $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$ mit den zugehörigen Komplementationsstämmen. Unten: Schematische Darstellung der Kolonie (ausgefüllte Kreise). Die gestrichelten Linien geben den Wildtypdurchmesser wieder.

Stämme mit Deletionen im Arc-System bilden verglichen mit dem Wildtyp auf Weichagarplatten deutlich kleinere Kolonien aus (Abb. 20) und sind im Schwimmen beeinträchtigt. Das Arc-System nimmt daher nicht nur auf Wachstum Einfluss, sondern reguliert nicht unerheblich auch die Motilität.

ArcS, HptA und ArcA regulieren die Biofilmbildung in *S. oneidensis* MR-1

Mikroorganismen kommen in freier Natur nicht als Reinkulturen disperser Einzelzellen vor, sondern akkumulieren an Grenzschichten. Dort bilden sie polymikrobielle Gemeinschaften in einer selbstgebildeten Matrix extrazellulärer Substanzen (61). Auch *S. oneidensis* MR-1 bildet solche Biofilme aus. Die Dynamik dieser Biofilme ist u. a. abhängig von ArcA (223). Zur Bestimmung, wie sich Deletionen im Arc-System quantitativ auf den Biofilm auswirken, wurden logarithmisch wachsende Zellen des Wildtyps sowie von Δarc -Deletionsstämmen in Mikrotiterplatten (MTP) für 24h inkubiert und anschließend auf Defekte in der Biofilmbildung (siehe Material und Methoden) hin analysiert (Abb. 15). Es stellte sich heraus, dass der ausgebildete Biofilm in $\Delta arcS$ und $\Delta hptA$ um ca. 50% und in $\Delta arcA$ sogar um ca. 80% reduziert war. Das Arc-System ist damit ein zentrales Element bei der Regulation der Bildung von Biofilmen in *S. oneidensis* MR-1.

Diese Art der quantitativen Erfassung von Biofilmen im MTP-Format lässt zwar erste Aussagen zu, ob und wie stark das Fehlen eines Gens die Biofilmbildung beeinflusst, jedoch gibt die Messung weder Aufschluss über die Gestalt des Biofilms, noch lässt sie Aussagen über die initialen Schritte in der Biofilmbildung – wie eine erste Anheftung an Oberflächen – zu.

Das Arc-System hat keinen Einfluss auf das initiale Anheften von *S. oneidensis* MR-1

Um zu untersuchen, ob die im MTP-Assay beobachtete Beeinträchtigung der Biofilmbildung auf einer Störung in der initialen Anheftung beruht, entwickelte ich einen Test basierend auf Messung der Chemolumineszenz, die durch das LuxCDABE-System aus *Photobacterium luminescens* hervorgerufen wird.

Zur Konstruktion eines solchen Reportersystems kombinierte ich in dem für *S. oneidensis* MR-1 replikativen Plasmid pBBR1-MCS3 (115) die *luxCDABE* Kasette aus pUC18T-miniTn7T-Gm-Lux (37) und den konstitutiven Promotor *tac* aus pLacTac (221).

Dazu wurde in einer ersten Klonierung *luxCDABE* über kompatible kohäsive Enden (*XhoI/KpnI*) mit pBBR1-MCS3 ligiert. In den resultierenden Vektor pBBR1-MCS3-Lux (Abb. 21) wurde in einer zweiten Klonierung stromaufwärts der *luxCDABE*-Sequenz der *Tac*-Promotor – nach Amplifikation mit den Primern *Bam*HI-tacP-Fw und *Pst*I-tacP-Rev und Restriktion (*Bam*HI/*Pst*I) – eingebracht. Der so entstandene Vektor pBBR1-MCS3-TacP-Lux (Abb. 21) produziert nach Transformation in *E. coli* und anschließender Konjugation in *S. oneidensis* MR-1 konstitutive Chemolumineszenz. Die Stärke des Chemolumineszenzsignals ist dabei direkt proportional zur Zellzahl.

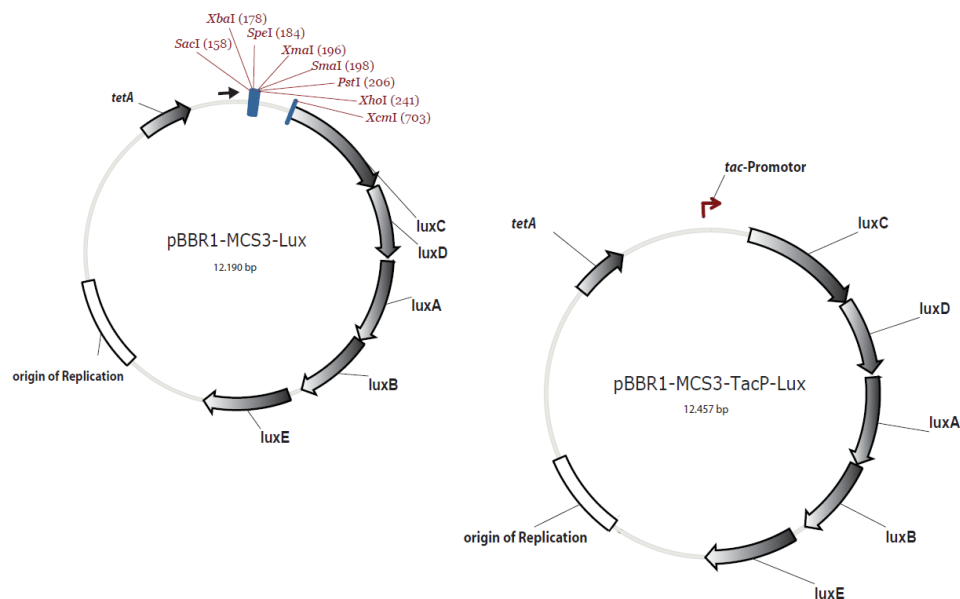


Abb.21: Die Vektoren pBBR1-MCS3-Lux und pBBR1-MCS3-TacP-Lux

pBBR1-MCS3-Lux (links) mit 12.190 bp kodiert für eine Tetracyclinresistenz (*tetA*), und eine Reporter-kassette für Chemolumineszenz (*luxCDABE*). Darüber hinaus besitzt er einen Replikationsursprung mit geringer Speziespezifität. Die MCS kann genutzt werden um transkriptionale Promotorfusionen zu erstellen, die nach erfolgreicher Klonierung mit dem Sequenzierprimer M13/pUC (-47) (schwarzer Pfeil) auf Sequenzgenauigkeit hin überprüft werden können. pBBR1-MCS3-TacP-Lux ist ein Derivat von pBBR1-MCS3-Lux und exprimiert durch die *tac*-Promotorsequenz konstitutiv *luxCDABE*.

Die Anheftung von Zellen an eine Oberfläche kann als der Quotient von Restlumineszenz (nach Verwerfen des Kulturüberstands) und Gesamtlumineszenz verstanden werden.

Zellen von *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp, sowie $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$ wurden in LB bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600\text{ nm}} = \sim 1$) angezogen und dann für 15 min in weißen, 96-kammerigen Polystyrol-MTP (Greiner Bio One, Frickenhausen) inkubiert. Die Gesamtlumineszenz wurde bestimmt. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgenommen, einmalig mit 150 μ l LB gewaschen und die verbleibende Chemolumineszenz gemessen (Abb. 22).

Frühere Studien (222) zeigen, dass Mutationen in Genen, die Strukturproteine der Flagelle kodieren, einen Defekt im initialen Anheften verursachen. Zwei dieser Gene kodieren für den Stator PomAB. In dem von mir eingesetzten Test adhärirt eine Mutante $\Delta pomAB$ nur zu ca. 1%, ebenso wie die unflagellierten Zellen von *S. oneidensis* MR-1 $\Delta flag$ (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu heften sich ca. 50% der Zellen des Wildtyps an die Oberfläche. Sowohl $\Delta flag$ als auch $\Delta pomAB$ eignen sich daher hervorragend als Kontrolle für fehlende Adhäsion.

Die Mutantenstämme $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$ zeigen mit ca. 50% Oberflächenhaftung ein dem Wildtyp vergleichbares Verhalten (Abb. 22). Der durch Mutationen im Arc-System ausgelöste Effekt im Biofilm beruht daher nicht auf einen mit diesem System detektierbaren Defekt im initialen Anheften.

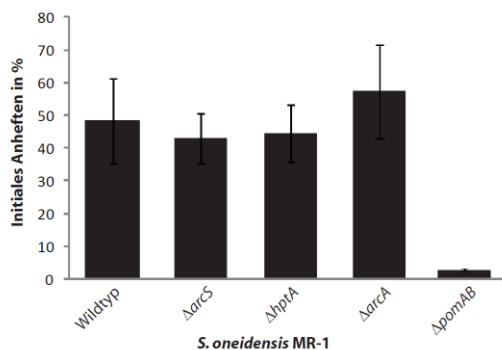


Abb.22: Vergleichende Analyse des Schwimmverhaltens von Stämmen mit Deletionen im Arc-System

Die Abbildung zeigt, wie sich *S. oneidensis* MR-1 beim initialen Anheften an eine Polystyroloberfläche verhält. Dabei ist das initiale Anheften als der Quotient von Gesamtlumineszenz und Restlumineszenz in % dargestellt. Bei dieser Art der Messung heften sich ca. 50% der Wildtypzellen direkt an die Oberfläche. Hingegen adhären Stämme mit Mutationen in Genen, die Proteine der Flagelle kodieren ($\Delta pomAB$), nur zu ca. 1%. $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$ heften sich initial jeweils zu 50% an und verhalten sich damit dem Wildtyp ähnlich.

Der von mir für *S. oneidensis* MR-1 entwickelte Test zur Detektion von Defekten im initialen Anheften ist schnell und funktional. Jedoch lassen sich aufgrund größerer Messungenauigkeiten nur signifikante Aussagen treffen, wenn zwei Chemolumineszenzquotienten um mehr als eine Zehnerpotenz voneinander abweichen (Abb. 22). Um die Frage zu beantworten, ob schon geringe Verhaltensänderungen im ersten Anheften den für Δarc beobachteten Biofilmphänotyp erklären (Abb. 15), muss eine Beobachtung der Entwicklung des Biofilms auf Einzelzellebene erfolgen.

Lebendfluoreszenzmarkierung von *S. oneidensis* MR-1 mit GFP, YFP und CFP

Zur mikroskopischen Verfolgung der Biofilmentwicklung in einer lebenden Zellkultur ist es notwendig, Einzelzellen so zu markieren, dass mit einer guten Detektierbarkeit im Mikroskop keine Beeinträchtigungen der Biofilmbildung verbunden sind. In früheren Studien (222) wurde mit Hilfe des miniTn7-Transposons (122) eine eGFP kodierende Sequenz ortsspezifisch stromaufwärts von *glmS* integriert (172) und so lebende Zellen von *S. oneidensis* MR-1 fluoreszenzmarkiert. Ebenso etablierte ich für meine Untersuchungen auf Basis der ortsspezifischen Integration mittels Tn7 ein System zur Lebendfluoreszenzmarkierung von *S. oneidensis* MR-1 (37) mit GFP. Darüber hinaus gelang es mir, das Spektrum der Markierungen um YFP und CFP zu erweitern. Die Proteine YFP und CFP lassen sich mit Licht der Wellenlänge 515 nm respektive 450 nm anregen. Die Exzitationsspektren überlappen dabei nicht. So können die Emissionen der entsprechenden Fluoreszenz unabhängig voneinander detektiert werden (Abb. 23). Das ermöglicht u. a. die Beobachtung kompetitiver Effekte bei der Kokultivierung zweier Stämme.

In einem ersten Schritt wurden die Sequenzen der die Fluoreszenzproteine kodierenden Gene sowie die Sequenz von *cat* (kodiert Chloramphenicol Acetyltransferase) mit *NotI* aus den Plasmiden pBK-miniTn7-*gfp2* (122), miniTn7(Gm) $P_{A1/04/03}$ -*eyfp*-a (122) und miniTn7(Gm) $P_{A1/04/03}$ -*ecfp*-b (122) ausgeschnitten und mit dem mit *Psp*OMI verdauten Vektor pUC18R6KTmini-Tn7T (37) ligiert (Abb. 23). Wie bei (37) beschrieben, wurde *S. oneidensis* MR-1 mit Hilfe der resultierenden Vektoren pUC18R6KTmini-Tn7T-*gfp*, pUC18R6KTmini-Tn7T-*yfp* und pUC18R6KTmini-Tn7T-*cfp* lebendfluoreszenzmarkiert.

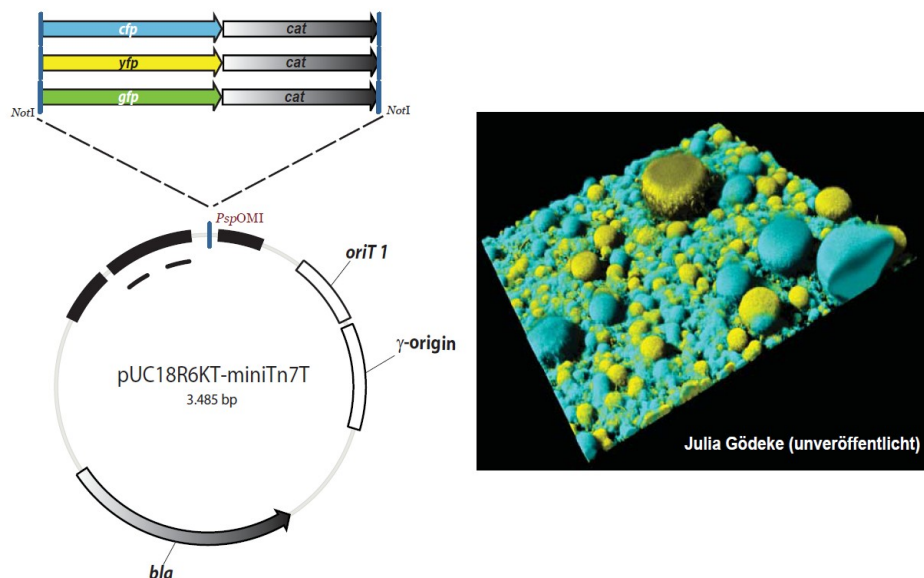


Abb.23: Lebendfluoreszenzmarkierung von *S. oneidensis* MR-1

Links: Im Bild sind die Vektoren pUC18R6KTmini-Tn7T-*gfp*, pUC18R6KTmini-Tn7T-*yfp* und pUC18R6KTmini-Tn7T-*cfp* zur Lebendfluoreszenzmarkierung von *S. oneidensis* MR-1 inklusive der Klonierungsstrategie dargestellt. In Analogie mit vorangegangenen Darstellungen sind der Replikationsursprung (γ -origin) und der Replikationsursprung für konjugativen Transfer (*oriT*) mit weißen Kästen gekennzeichnet. Die β -Lactamase vermittelt eine Ampicillinresistenz und wird durch *bla* kodiert. Die Chloramphenicol Acetyltransferase vermittelt eine Chloramphenicolresistenz und wird durch *cat* kodiert. Xfp markiert entsprechend der abgebildeten Farbe Gene, die eine Fluoreszenzmarkierung von *S. oneidensis* MR-1 ermöglichen. Schwarze Kästen markieren Sequenzregionen, die zur Integration der *xfp-cat*-Kassette ins Genom benötigt werden. Rechts: Abgebildet ist ein Biofilm von *S. oneidensis* MR-1. Dabei wurden jeweils zu gleichen Teilen eine YFP- und eine CFP-markierte Kultur inokuliert und die Biofilmentwicklung über 72h verfolgt.

Zur Überprüfung des Systems wurden zu gleichen Teilen Zellen einer CFP- und einer YFP-markierten Kultur in ein Flusskammersystem inokuliert und die Biofilmbildung aufgezeichnet (Julia Gödeke, unveröffentlicht). Das Aussehen des Biofilms (Abb. 23) ist vergleichbar mit dem aus früheren Studien (222). Darüber hinaus entspricht die Farbverteilung von Gelb und Blau (Abb. 23) dem Verhältnis zum Zeitpunkt der Inokulation. Weder der Prozess der Fluoreszenzmarkierung von *S. oneidensis* MR-1 noch die Überproduktion unterschiedlicher Fluoreszenzproteine wirkt sich somit negativ auf die Biofilmbildung aus. Durch Anwendung des miniTn7-Systems auf *S. putrefaciens* CN-32 (172) gelang es mir, auch diese Spezies mit einer GFP-Lebendfluoreszenz zu versehen (Daten nicht gezeigt).

$\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$ kolonisieren Oberflächen initial effektiver als der Wildtyp

Die Beobachtung fluoreszenzmarkierter Zellen im Flusskammersystem gibt sowohl Aufschluss über den Reifungsprozess eines Biofilms, als auch über die ersten Schritte der Zellen bei der Kolonisierung von Oberflächen.

S. oneidensis MR-1 Wildtyp-Zellen sowie die Deletionsmutanten $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$ wurden mit GFP fluoreszenzmarkiert und in einem Flusskammersystem auf ihre Fähigkeit, Oberflächen zu kolonisieren, untersucht. Dazu wurde die Oberfläche der Flusskammer 4h nach Inokulation in LM (lactate medium) fotografiert und in Bezug auf Unterschiede zwischen Wildtyp und Δarc -Deletionsstämmen ausgewertet.

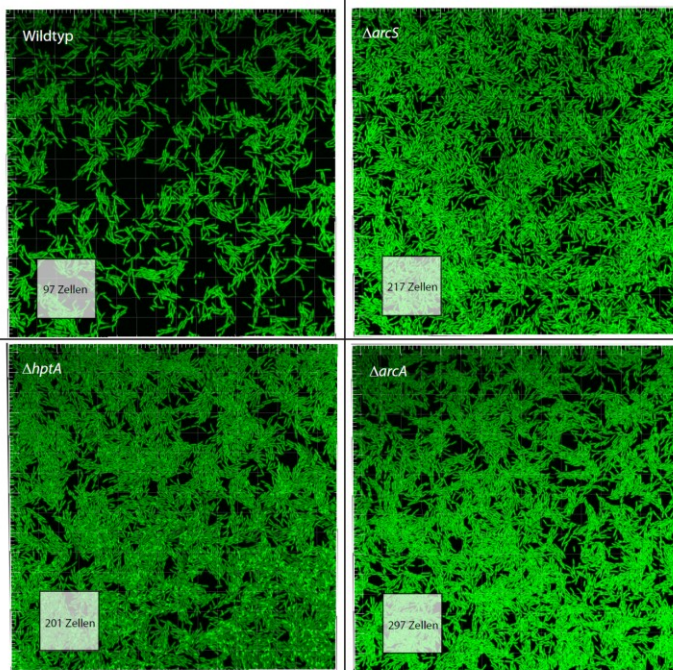


Abb.24: Oberflächenbesiedlung im Flusskammersystem

Die Abbildung zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Oberfläche eines Flusskammersystems nach 4h Inkubation mit *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp sowie $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$. Dabei ist die Oberflächenabdeckung mit 107 Zellen/mm² im Wildtyp verglichen mit $\Delta arcS$ (239 Zellen/mm²) und $\Delta hptA$ (221 Zellen/mm²) um Faktor zwei geringer. Für $\Delta arcA$ (343 Zellen/mm²) beträgt der Faktor drei. Die grauen Kästen innerhalb der Fluoreszenzaufnahmen umrahmen eine Fläche von 0,9mm².

Zellen des Wildtyps besiedeln dabei die Oberfläche mit 107 Zellen/mm², während sich für die Deletionsstämmen $\Delta arcS$ Werte von 239 Zellen/mm², für $\Delta hptA$ von 221 Zellen/mm² und für $\Delta arcA$ von 343 Zellen/mm² ergeben. Damit ist die Oberflächenbesiedlungsdichte in $\Delta arcS$ und $\Delta hptA$ um Faktor zwei und in $\Delta arcA$ sogar um Faktor drei höher als die des Wildtyps. Die Besiedlung der abiotischen Oberfläche im Flusskammersystem wird in nicht unerheblicher Weise durch das Arc-System von *S. oneidensis* MR-1 mitreguliert.

$\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$ verlieren die Fähigkeit zur Ausbildung dreidimensionaler Strukturen während der Reife des Biofilms

Um zu verfolgen, inwieweit sich die Reifung des Biofilms in $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$ von der des Wildtyps unterscheidet, kultivierte ich die entsprechenden GFP-fluoreszenzmarkierten *S. oneidensis* MR-1 Stämme in einem Flusskammersystem in LM für 48h. Nach 4h, 24h und 48h nahm ich ein dreidimensionales Bild des Biofilms in 20facher und 63facher Vergrößerung auf (Abb. 25).

In den ersten 4 h beginnt der Wildtyp mit der Besiedlung der Oberfläche. Dabei breiten sich die Zellen vorzugsweise horizontal einzelschichtig aus. Teilweise ist aber bereits ein Dickenwachstum des Biofilms zu beobachten (Abb. 25). 20h später ist die Oberfläche geschlossen und vielschichtig besiedelt und erste dreidimensionale Strukturen werden ausgebildet. Nach weiteren 24 h ist die Landschaft des Biofilms von einer Vielzahl dreidimensionaler Strukturen geprägt, die sich über die vielschichtige „Grundsubstanz“ des Biofilms erheben. Dabei fällt auf, dass im Gegensatz zum 24 h-Zeitpunkt die Oberfläche nicht mehr restlos mit Zellen bedeckt ist.

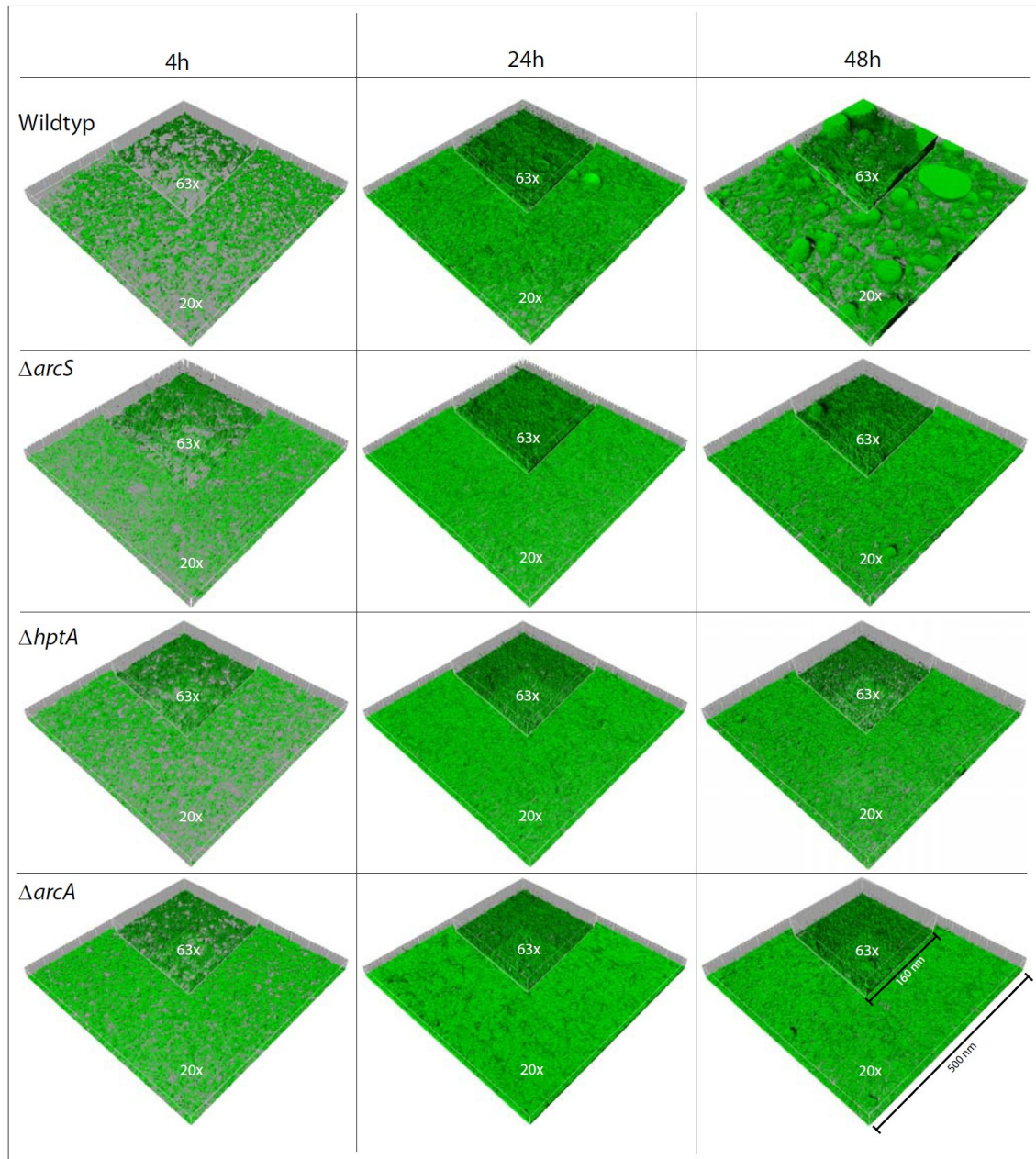


Abb.25: Biofilmbildung von *S. oneidensis* MR-1 mit Deletionen im Arc System im Flusskammersystem

Die Abbildung zeigt als Schattenprojektion die Biofilmstadien verschiedener GFP-fluoreszenzmarkierter *S. oneidensis* MR-1 Stämme im Vergleich. Dabei zeigt Reihe Eins die Entwicklung eines Biofilms im Wildtyp. Die Reihen Zwei bis Vier bilden die Entwicklung von $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$ ab. Der Vergrößerungsfaktor der Aufnahme ist in der Abbildung gesondert aufgeführt (20x und 63x).

Die Mutantenstämme $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$ zeigen – verglichen mit dem Wildtyp – eine unterschiedliche Entwicklung des Biofilms. Vergleiche der Mutantenstämme untereinander zeigten ähnliche Biofilme zu jedem der aufgenommenen Zeitpunkte (Abb.25).

Nach 4 h ist zu erkennen, dass sich $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$ horizontal deutlich weiter ausbreiten als *S. oneidensis* MR-1. Das Dickenwachstum ist hingegen zu diesem Zeitpunkt mit dem Wildtyp vergleichbar. Nach 24 h ähneln sich die Aufnahmen von Wildtyp- und Mutantenbiofilmen. Lediglich die sporadisch im Wildtyp auftauchenden dreidimensionalen Strukturen findet man in keiner der Mutanten. Nach 48 h sind Wildtyp und Mutantenstämme wieder deutlich voneinander verschieden. Die Fähigkeit zur Ausbildung dreidimensionaler Strukturen ist in den Mutanten $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$ völlig verloren gegangen. Verglichen mit dem Aussehen nach 24 h erfolgte nur noch ein leichtes Dickenwachstum. Ansonsten sind keine Unterschiede im Biofilmphänotyp zu erkennen.

Das Arc-System von *S. oneidensis* MR-1 verändert das horizontale Ausbreitungsverhalten auf einer Oberfläche, sowie es verhindert, dass sich bei der Reifung des Biofilms dreidimensionale Strukturen ausbilden. Jedoch bleibt unklar, durch die Regulation welcher Gene Arc Einfluss auf den Biofilm nimmt.

Das Arc-System kontrolliert die Biofilmentwicklung durch AggA und MxdABCD

Bei der Auswertung der Transkriptomdaten von $\Delta arcS$ war die Genexpression auch solcher Gene verändert, die einen dokumentierten Einfluss auf die Biofilmbildung von *S. oneidensis* MR-1 haben. So werden sowohl die Gene *mxdABCD* (221) als auch *aggA* (45) durch ArcS in ihrer Expression beeinflusst (Abb. 26).

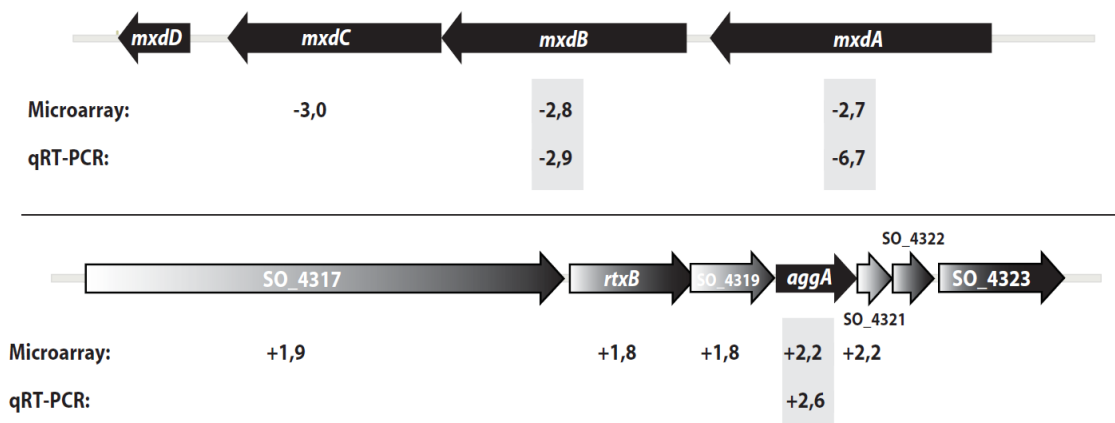


Abb.26: Genetische Organisation von *mxdABCD* und *aggA*

Die Abbildung zeigt die genetische Organisation von *mxdABCD* (oben) und *aggA* (unten). Die Gene meines Interesses sind dabei als schwarze Pfeile dargestellt. Gene, die in einem möglichen genetischen Kontext stehen, aber nicht näher untersucht wurden, sind als Gradientenpfeile abgebildet. Die Regulation der Gene durch ArcS ist als Vielfaches der Expression bezogen auf dem Wildtyp (Zahlen unterhalb der Gene) dargestellt.

MxdABCD

In einer Mutagenesestudie zur Identifizierung biofilmrelevanter Gene zeigten fünf analysierte Stämme unabhängig voneinander Insertionen von Tn5 in *mxdABCD* oder der zugehörigen Promotorregion (221). Die Analyse der aa-Sequenzen sagt für MxdA ein 462 aa langes GGDEF-Domänenprotein, für MxdB eine 403 aa lange membrangebundene Glycosyltransferase, für MxdC eine 351 aa lange membrangebundene Effluxpumpe und für MxdD ein 118 aa langes Membranprotein unbekannter Funktion voraus (221). Untersuchungen der Biofilmentwicklung in den Deletionsstämmen $\Delta mxdA$, $\Delta mxdB$, $\Delta mxdC$ und $\Delta mxdD$ in einem Flusskammersystem zeigten einen deutlich vom Wildtyp unterscheidbaren Biofilmphänotyp (221).

AggA

Studien mit Rifampicin behandelten Kulturen von *S. oneidensis* MR-1 führten zur Isolierung einer hyperaggregierenden Mutante. Diese zeigt in 2D-Gel-Proteomanalysen eine deutliche Überproduktion des Proteins SO_4320 (AggA) (45). *aggA* ist Bestandteil eines RTX-Operons (45) und kodiert für einen TolC-artigen aktiven Kanal (220). Stämme mit Deletionen in *aggA* verlieren die Fähigkeit, an Glasoberflächen zu adhären und bilden im Vergleich zum Wildtyp deutlich weniger Biofilm aus (45).

Das putative *mxdABCD*-Operon wird in $\Delta arcS$ verglichen mit dem Wildtyp um Faktor 3 weniger exprimiert. Die Expression von *aggA* hingegen wird um Faktor ~2,5 positiv beeinflusst (Abb. 26).

Würde die Reversion der Expression von *aggA* und *mxdABCD* in einem $\Delta arcS$ Hintergrund den dort beobachteten Biofilmphänotyp dem des Wildtyps wieder annähern? Zur Beantwortung dieser Frage konstruierte ich zum einen die Deletionsstämmen $\Delta aggA$ und $\Delta arcS/\Delta aggA$ und zum anderen den induzierbaren Vektor pBBR1-MCS5-BAD-*mxdABCD*. Diesen Vektor transformierte ich anschließend in *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp, $\Delta arcS$, $\Delta aggA$ und $\Delta arcS/\Delta aggA$.

Eine Deletion von *aggA* führt auch zur Eliminierung der korrespondierenden RNA. Sowohl in der Einzeldelation $\Delta aggA$ als auch in der Doppelmutante $\Delta arcS/\Delta aggA$ erfolgt demnach keine weitere Expression von *aggA* und auf diese Weise wird eine negative Regulation simuliert.

Der Vektor pBBR1-MCS5-BAD-*mxdABCD* erlaubt die kontrollierte Transkription von *mxdABCD* in Abhängigkeit vom BAD-Promotor. Unter Zusatz von 0,2% L-Arabinose zu den plasmidtragenden Stämmen *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp, $\Delta arcS$, $\Delta aggA$ und $\Delta arcS/\Delta aggA$ wird die Expression gezielt induziert und simuliert die erhöhte Expression.

In Abbildung 27 ist der Biofilm von *S. oneidensis* MR-1 und $\Delta arcS$ in Abhängigkeit der veränderten Expression für *mxdABCD* und *aggA* nach 24 und 48 h abgebildet. Dabei zeigt die obere Reihe Aufnahmen von Wildtyp und $\Delta arcS$. Die Entwicklung der jeweiligen Stämme entspricht den Beschreibungen von S. 52-53.

Überexprimiert man *mxdABCD* im Wildtyp, so ist die Ausbildung dreidimensionaler Strukturen schon nach 24 h zu beobachten (Abb. 27). Auch ist die Zahl der dreidimensionalen Strukturen gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöht. Die Oberflächenabdeckung durch die Zellen und die Ausbildung eines „Biofilmmasens“ scheinen durch die Überexpression von *mxdABCD* unterdrückt zu werden. In $\Delta arcS$ führt die Überexpression von *mxdABCD* ebenso wie im Wildtyp zu einer Beeinträchtigung in der horizontalen Oberflächenabdeckung der Zellen. Interessanterweise jedoch erlangt $\Delta arcS$ die verlorene Fähigkeit zurück, dreidimensionale Strukturen auszubilden. Jedoch unterscheidet sich $\Delta arcS$ + pBBR-MCS5-BAD-*mxdABCD* im Aussehen weiterhin deutlich vom Wildtyp.

Die Deletion von *aggA* führt sowohl im Wildtyp wie auch in der Mutante $\Delta arcS$ zu einer verminderten Fähigkeit, an die abiotische Oberfläche der Flusskammer anzuheften, die Zellen agglutinieren und bilden Klumpen. Das erklärt möglicherweise auch die fehlende Bildung einer geschlossenen Zellschicht (Abb. 27). Die zeitliche Ausprägung dreidimensionaler Strukturen und ebenso Zahl und Größe bleiben in $\Delta aggA$ verglichen mit dem Wildtyp unverändert. Die Deletion von *aggA* in $\Delta arcS$ führt dazu, dass $\Delta arcS/\Delta aggA$ dreidimensionale Strukturen bildet, die in Größe und Zahl denen des Wildtyps entsprechen.

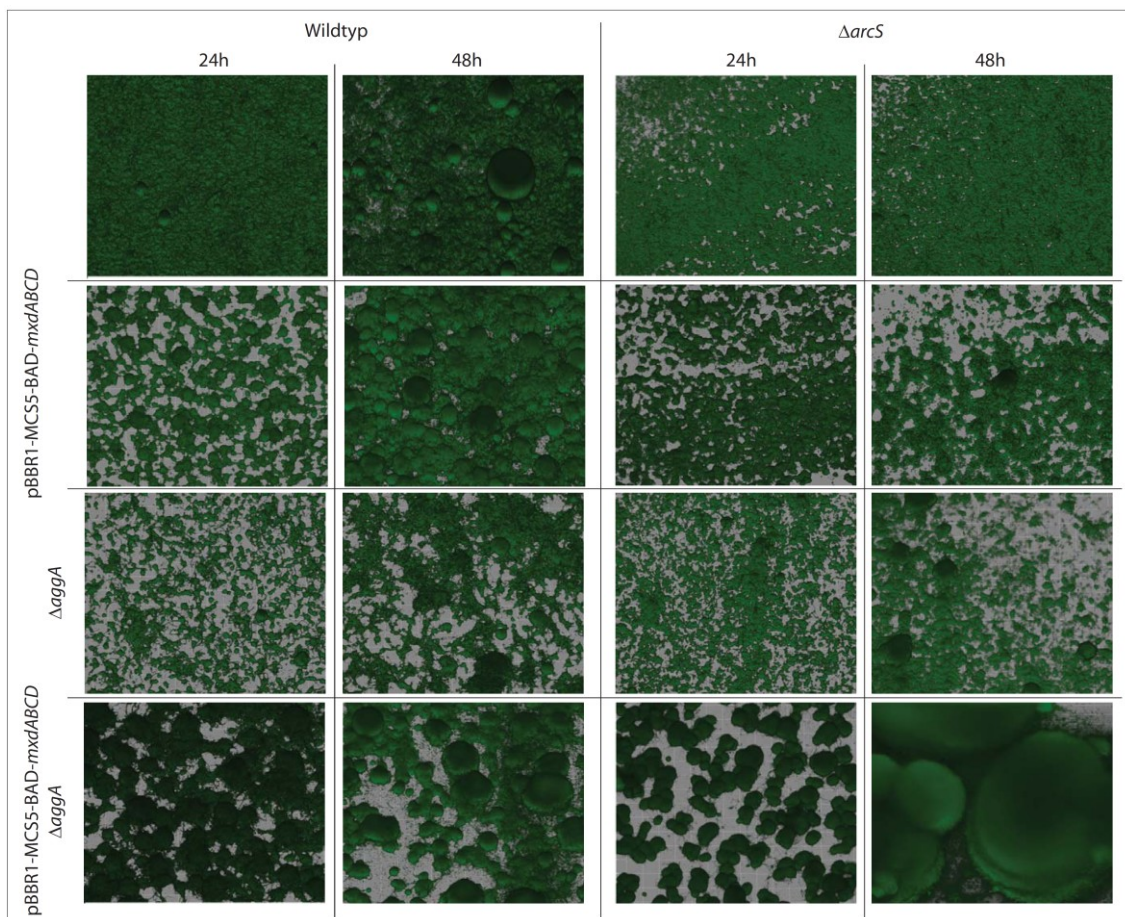


Abb.27: Biofilmbildung von *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp und $\Delta arcS$ mit Deletionen in *aggA* sowie die Überexpression von *mxdABCD*

Die Abbildung zeigt die Biofilmstadien verschiedener GFP-fluoreszenzmarkierter *S. oneidensis* MR-1 Stämme im Vergleich. Dabei zeigt Reihe 1 die Entwicklung eines Biofilms im Wildtyp und $\Delta arcS$ nach 24h und 48h. Die Reihen 2 bis 4 bilden die Entwicklung von Wildtyp und $\Delta arcS$ mit Deletion in *aggA* (Reihe 3 und 4) und/oder Expression von *mxdABCD* (Reihe 4 und 2) von pBBR1MCS5-BAD-*mxdABCD*. Der Vergrößerungsfaktor der Aufnahme beträgt 20.

Deletiert man *aggA* bei gleichzeitiger Überexpression von *mxdABCD*, so erhält man mit $\Delta aggA$ + pBBR1-MCS5-BAD-*mxdABCD* einen Stamm, welcher bereits nach 24h dreidimensionale Strukturen ausbildet und in seiner Fähigkeit beeinträchtigt ist, flächenhafte Biofilme auszubilden. $\Delta arcS/\Delta aggA$ + pBBR1-MCS5-BAD-*mxdABCD* ist ein Stamm, der horizontales Flächenwachstum vollständig zu unterdrücken scheint und nur noch aus dreidimensionalen Strukturen besteht (Abb. 27). Diese Strukturen unterscheiden sich sowohl in Zahl, im zeitlichen Auftreten und in Größe deutlich von denen des Wildtyps.

Bei der Untersuchung, welche Gene bei der veränderten Biofilmbildung in $\Delta arcS$ eine Rolle spielen, identifizierte ich *aggA* und das mögliche Operon *mxdABCD*. Die Umkehr der Expression bezogen auf $\Delta arcS$ (Abb. 26) führte auch zu einer Umkehr des in $\Delta arcS$ beobachteten Biofilmphänotyps. Jedoch führte die veränderte Expression von *aggA* und *mxdABCD* im Hintergrund von $\Delta arcS$ nie zur vollständigen Wiederherstellung des *S. oneidensis* MR-1 Wildtypphänotyps. Allerdings konnte der Effekt der erhöhten Oberflächenabdeckung nach initialer Anheftung abgeschwächt und dem Wildtypniveau angeglichen werden (Abb. 24). Darüber hinaus gewann $\Delta arcS$ auch die verlorene Fähigkeit zurück, dreidimensionale Strukturen zu bilden. Damit stellen *aggA* und *mxdABCD* wichtige Schlüsselselektene bei der Regulation der Biofilmbildung durch ArcS dar.

5.1.5 Interaktionsstudien mit ArcS, HptA, und ArcA

Analysen der Phänotypen von $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$ in Bezug auf Wachstum, Biofilmbildung und Motilität ebenso wie Transkriptomdaten deuten auf ein Zusammenspiel von ArcS, HptA und ArcA in einem TCS-System. Wenn dem so ist, interagieren die drei Komponenten miteinander und ein Phosphogruppentransfer erfolgt zwischen Sensor kinase und Antwortregulator über HptA. Zur Demonstration direkter funktionaler Interaktion griffen wir auf zwei Strategien zurück. Die erste Strategie sollte in einem bakteriellen Zwei-Hybridsystem (BTH) die spezifische Interaktion von ArcS, HptA und ArcA *in vivo* belegen, die zweite Strategie den Phosphogruppenübertrag *in vitro* an den gereinigten Proteinen zeigen.

ArcS, HptA und ArcA interagieren im bakteriellen Zwei-Hybridsystem

In Zusammenarbeit mit Lucas Binnenkade konzipierte ich einen Test basierend auf dem BTH konstruiert von Karimova *et al.* 1998 (108). Zur Produktion sowohl aminoterminaler als auch carboxyterminaler Fusionen mit T25 und T18 wurden *arcS*, *hptA* und *arcA* in die BTH-Expressionsvektoren kloniert. T25 und T18 bilden dabei Segmente der katalytischen Domäne der *Bordetella pertussis* Adenylatzyklase CyaA.

Tabelle 4: Interaktionsstudien im Bakteriellen Zwei-Hybridsystem – Stammliste

Stamm	Plasmid	plasmidkodiertes Proteinfragment	Genelocus	Selectionsmarker
BTH101 ^a	pUT18C_PAS_ArcS pKT25_ArcS	PASI-PASII-HisKA-HATPase-Rec-Rec PASI-PASII-HisKA-HATPase-Rec-Rec	SO_0577 (<i>arcS</i>) SO_0577 (<i>arcS</i>)	Amp ^R Kan ^R
BTH101 ^a	pUT18_PAS_ArcS pKNT25_HptA	PASI-PASII-HisKA-HATPase-Rec-Rec HptA ^d	SO_0577 (<i>arcS</i>) SO_1327 (<i>hptA</i>)	Amp ^R Kan ^R
BTH101 ^a	pUT18C_PAS_ArcS pKNT25_ArcA	PASI-PASII-HisKA-HATPase-Rec-Rec ArcA ^d	SO_0577 (<i>arcS</i>) SO_3988 (<i>arcA</i>)	Amp ^R Kan ^R
BTH101 ^a	pUT18_HptA pKT25_HptA	HptA ^d HptA ^d	SO_1327 (<i>hptA</i>) SO_1327 (<i>hptA</i>)	Amp ^R Kan ^R
BTH101 ^a	pUT18C_HptA pKT25_ArcA	HptA ^d ArcA ^d	SO_1327 (<i>hptA</i>) SO_3988 (<i>arcA</i>)	Amp ^R Kan ^R
BTH101 ^a	pUT18C_ArcA pKNT25_ArcA	ArcA ^d ArcA ^d	SO_3988 (<i>arcA</i>) SO_3988 (<i>arcA</i>)	Amp ^R Kan ^R
BTH101 ^a	pUT18C_BarA pKT25_BarA	HAMP-HisKA-HATPase-Rec-Hpt HAMP-HisKA-HATPase-Rec-Hpt	SO_3457 (<i>barA</i>) SO_3457 (<i>barA</i>)	Amp ^R Kan ^R
BTH101 ^a	pUT18C_PAS_ArcS pKT25_PAS_ArcB	PASI-PASII-HisKA-HATPase-Rec-Rec PASII-HisKA-HATPase-Rec-Hpt	SO_0577 (<i>arcS</i>) b3210 (<i>arcB</i>)	Amp ^R Kan ^R
BTH101 ^a	pUT18C_HisKA_ArcS pKT25_HisKA_ArcB	HisKA-HATPase-Rec-Rec HisKA-HATPase-Rec-Hpt	SO_0577 (<i>arcS</i>) b3210 (<i>arcB</i>)	Amp ^R Kan ^R
BTH101 ^a	pUT18C-zip ^b pKT25-zip ^b	GCN4 ^d GCN4 ^d	YEL009C (<i>GCN4</i>) YEL009C (<i>GCN4</i>)	Amp ^R Kan ^R
BTH101 ^a	pUT18C ^c pKT25 ^c	- -	- -	Amp ^R Kan ^R

^aBTH101 Stamm bereitgestellt von EUROMEDEX, Frankreich^bPlasmid Positivkontrolle Hefe Leucinzipper), bereitgestellt von EUROMEDEX, Frankreich^cLeerplasmid Negativkontrolle, bereitgestellt von EUROMEDEX, Frankreich^dVolllängenproteinverändert nach Lassak *et al.* (123)

Tabelle 4 und Abbildung 28 sind verändert aus Lassak *et al.* entnommen (123) und zeigen zusammengefasst die für diese Arbeit wichtigen Stämme und Interaktionen. Ausführliche Informationen über alle getesteten Fragmente und Kombinationen der BTH-Analyse des *S. oneidensis* MR-1 Arc-Systems sind im Praxismodulbericht „Characterization of an atypical Arc two-component regulatory system in *S. oneidensis* MR-1: a bacterial two-hybrid analysis“ von Lucas Binnenkade veröffentlicht (20).

Im Fall von HptA und ArcA kodieren die für die Interaktionsstudien eingesetzten Plasmide stets das Volllängenprotein. Im Fall von ArcS sparten wir die Sequenzen des periplasmatischen Bereichs und der TM-Domänen aus, da es unwahrscheinlich ist, dass diese Abschnitte für funktionale Protein-Protein-Interaktionen benötigt werden. Ebenso wie für ArcS testeten wir von der in unsere Untersuchungen mit einbezogenen HK BarA nur den zytoplasmatischen Carboxyterminus.

Die Hybrid-HK BarA bildet zusammen mit dem RR UvrY ein funktionales TCS-System in *E. coli* (179) und *S. oneidensis* MR-1 (Binnenkade & Lassak *et al.*, unveröffentlicht). Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zu *E. coli* ArcB im Kinase- (57%) und Empfängerdomänenbereich (58%), die denen von ArcS und *E. coli* ArcB vergleichbar sind (Abb. 13), stellte die Hybrid-HK BarA eine geeignete Spezifitätskontrolle im BTH dar. Die Untersuchungen ergaben, dass alle in unserem Test eingesetzten Komponenten mit sich selbst interagieren (Abb. 28). Dieses Ergebnis entsprach unserer Erwartung und steht im Einklang mit dem Wissen, dass TCS-Proteine homodi(multi)merisieren (104, 129, 213). Die Studie zeigt darüber hinaus eine deutliche Interaktion zwischen Komponenten ArcS, HptA und ArcA (Abb. 28) und damit allen Mitspielern des putativen Arc-Systems von *S. oneidensis* MR-1. Im Gegensatz dazu konnte keine Interaktion zwischen BarA und HptA oder BarA und ArcA beobachtet werden. Damit sind die zwischen ArcS, HptA und ArcA detektierten Interaktionen das Ergebnis spezifischer Zusammenarbeit im selben TCS-System.

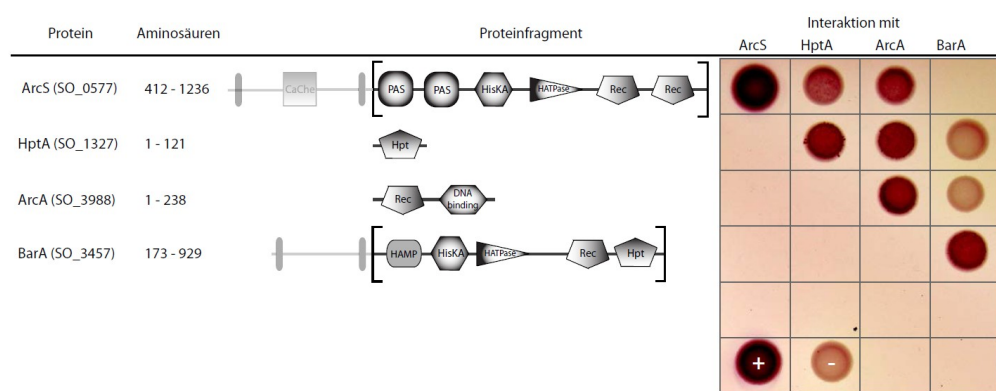


Abb.28: *In vivo* Interaktionsuntersuchungen der Komponenten des *S. oneidensis* MR-1 Arc-Systems ArcS, HptA und ArcA im bakteriellen Zwei-Hybridsystem

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der *in vivo* Interaktionsuntersuchungen im bakteriellen Zwei-Hybridsystem. In der linken Bildhälfte sind die getesteten Proteine mit Domänenstruktur dargestellt. Dabei sind nicht getestete Bereiche der Proteine ArcS und BarA gebleicht. Die rechte Bildhälfte zeigt den Ausschnitt einer McConkey-Agarplatte mit 3 µl Tropfen des zu testenden BTH101-Stammes (vgl. Tabelle 4) nach 72 h Inkubation bei Raumtemperatur. Die Intensität der Rotfärbung der Kolonie ist ein Maß für die Stärke der getesteten Interaktion.

ArcS dephosphoryliert *in vitro* ArcA über HptA

Parallel zu der Interaktionsanalyse im BTH-System führte ich eine Phosphogruppentransferanalyse mit den aufgereinigten Proteinen ArcS, HptA und ArcA *in vitro* durch. Auch hier diente als Spezifitätskontrolle die HK BarA.

HptA wurde als aminoterminal GST-Fusionsprotein aufgereinigt, alle anderen Proteine als rekombinante aminoterminal His₆-Fusionsproteine. ArcS reinigte ich als lösliche Variante nur unter Erhalt der katalytischen Region (aa 694-1236; vgl. Abb. 13) auf. Der Versuch, Versionen von ArcS auch unter Erhalt der PAS-Domänen zu generieren, wurde parallel mehrfach unternommen. Jedoch gelang es selbst durch Einsatz verschiedener Fusionen (His₆ und GST) sowie Rekonstitutionen aus Einschlusskörperchen nicht, gleichzeitig lösliche und funktionale Varianten herzustellen (Daten nicht gezeigt). Das Konstrukt zur Überproduktion von BarA wurde als zytoplasmatische Variante sowohl als Version mit HAMP-Domäne (181-929) als auch, genau wie ArcS, als Version ohne sensorische Domäne (292-929) generiert.

Die Aufreinigung der Proteine sowie die Konstruktion der Überexpressionsplasmide erfolgte z.T. in Zusammenarbeit mit Anna-Lena Henche. Detaillierte Protokolle sowie Proteinanalysen können in ihrer Bachelorarbeit mit dem Thema „Untersuchung des Proteins SO_0577 als potenzielle Sensorkinase des Arc-Systems in *Shewanella oneidensis* MR-1“ nachgelesen werden (82).

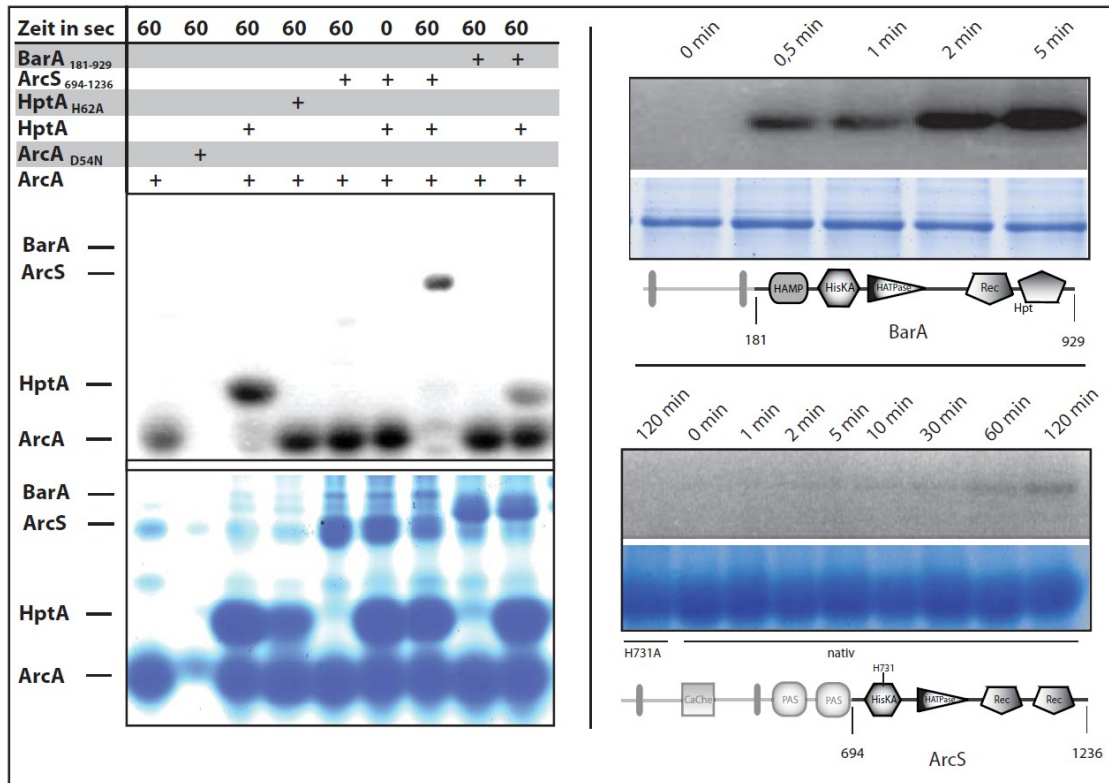


Abb.29: Autoradiographieuntersuchung von *in vitro* Interaktionen der Komponenten des *S. oneidensis* MR-1 Arc-Systems ArcS, HptA und ArcA

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen auf Interaktion (links) und Kinaseaktivität (rechts) mittels Autoradiographie. Dabei sind sowohl die im Autoradiographen detektierte Radioaktivität als auch die korrespondierenden Proteine (Coomassie G250 - Brillantblau Färbung) dargestellt. Links: Je 10 µM radioaktiv markiertes ArcA oder ArcA_{D54N} wurden mit äquimolaren Mengen HptA und ArcS oder BarA für 60 s inkubiert. Phosphorgruppentransfer wurde durch Detektion der Radioaktivität bestimmt. Dabei interagieren in einem reversen Phosphorelaissystem ArcS, HptA und ArcA miteinander. Rechts: Analyse der Kinaseaktivität von ArcS und BarA. Nach Zugabe von radioaktiven [γ -³²P]-ATP zu 10 µM HK erfolgte eine Inkubation bei 30°C. Zu definierten Zeiten wurde die Kinasereaktion abgestoppt und die Radioaktivität bestimmt. Dabei ist BarA bereits nach 5 min gesättigt. ArcS hingegen zeigt selbst nach zwei Stunden nur ein vergleichsweise geringes Kinaseaktivität. Die korrespondierende Punktmutation im katalytischen ArcS-HK_{H731A} lässt sich durch Zugabe von [γ -³²P]-ATP nicht phosphorylieren.

Die Aktivität der gereinigten Sensorkinasen wurde dabei durch Inkubation der Kinasen mit [γ -³²P]-ATP getestet (Abb. 29). BarA zeigt dabei bereits nach 5 min eine Sättigung mit Phosphat. Im Gegensatz dazu ist bei ArcS auch nach 2h nur ein schwaches radioaktives Signal zu verzeichnen. In der Punktmutation ArcS-HK_{H731A} findet keine Phosphorylierung mehr statt.

Um nun zu testen, ob ArcS und/oder BarA ArcA transphosphorylieren können, wurden ArcS und BarA entsprechend ihrer Kinetiken mit [γ -³²P]-ATP radioaktiv markiert und mit ArcA und/oder HptA inkubiert. Jedoch konnte weder BarA noch ArcS radioaktives Phosphat auf ArcA übertragen (Daten nicht gezeigt).

Für *E. coli* ArcB ist bekannt, dass es sich um ein bifunktionales Enzym handelt, welches nicht nur ArcA phosphorylieren sondern auch dephosphorylieren kann (68, 175). In einem zweiten Ansatz

testete ich auf einen reversen Phosphogruppentransfer von ArcA auf ArcS (Abb. 28). Dafür wurden ArcA und eine punktmutierte Version von ArcA (ArcA_{D54N}) im putativen katalytischen Asp₅₄ mit [$\gamma^{32}\text{P}$]-Acetylphosphat inkubiert. Nur natives ArcA konnte unter den getesteten Bedingungen phosphoryliert werden. Diese Tatsache ist ein deutlicher Hinweis für die korrekte Vorhersage des katalytischen Aspartats. Im Gegensatz zu ArcA konnte weder aufgereinigtes natives HptA, noch die korrespondierende punktmutierte Version HptA_{H62A} mit [$\gamma^{32}\text{P}$]-Acetylphosphat oder [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP radioaktiv markiert werden (Daten nicht gezeigt). Inkubierte man aber phosphoryliertes ArcA mit GST-HptA, so erfolgte ein schneller Phosphogruppenübertrag von ArcA auf HptA. Dieser Übertrag konnte nicht beobachtet werden, wenn die native Version von HptA durch HptA_{H62A} ausgetauscht wurde. Damit scheint das putativ katalytische Histidin von HptA tatsächlich essentiell für den reversen Phosphogruppentransfer zu sein.

Nach 60 s Inkubation von phosphoryliertem ArcA mit ArcS und HptA akkumulierte ein radioaktives Signal auf ArcS und zeigt damit Phosphogruppentransfer von ArcA auf ArcS. Dieser Transfer wird jedoch nicht beobachtet wenn man allein die Proteine ArcA und ArcS miteinander inkubiert. Damit kann zwischen ArcA und ArcS ohne die Anwesenheit von HptA keine Phosphogruppe ausgetauscht werden. Wie auch beim BTH-System diente die Sensorkinase BarA als Spezifitätskontrolle. Unabhängig von HptA konnte hier wie erwartet kein Phosphogruppentransfer von ArcA auf BarA beobachtet werden (Abb. 28).

Meine Versuchsergebnisse zeigen sowohl spezifische Interaktion als auch Phosphogruppenübertrag zwischen den drei Komponenten ArcS, HptA und ArcA. Zusammen mit den phänotypischen Untersuchungen und Transkriptionsanalysen an $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$ rekonstituiert sich ein funktionales Arc-System in *S. oneidensis* MR-1 aus ArcS, HptA und ArcA.

5.1.6 Phänotypische Untersuchungen am ArcS Ortholog Sput_CN32_3300

Bioinformatische Untersuchungen an ArcS, HptA und ArcA identifizieren orthologe Proteine auf Basis der sequenzierten Genome in allen Shewanellen mit einer Sequenzidentität von über 80% (Tabelle 3). Auch *Shewanella putrefaciens* CN-32 kodiert ein orthologes Protein zu ArcS – SputCN32_3300 (94% aa-Sequenzidentität).

S. putrefaciens CN-32 wurde mehr als 3.000 km entfernt vom Lake Oneida, bei Albuquerque in New Mexico (USA) aus grundwasserführenden Schiefersandsteinsedimentschichten 250 m unter der Oberfläche isoliert (64). Damit unterscheidet sich das Habitat von *S. putrefaciens* CN-32 deutlich von dem *S. oneidensis* MR-1.

Um die Frage zu beantworten, ob über die Konservierung der Sequenz hinaus auch eine funktionale Konservierung besteht, deletierte ich SputCN32_3300 und untersuchte den Phänotypen des Stammes in Bezug auf Biofilmbildung und Wachstum (Abb. 29).

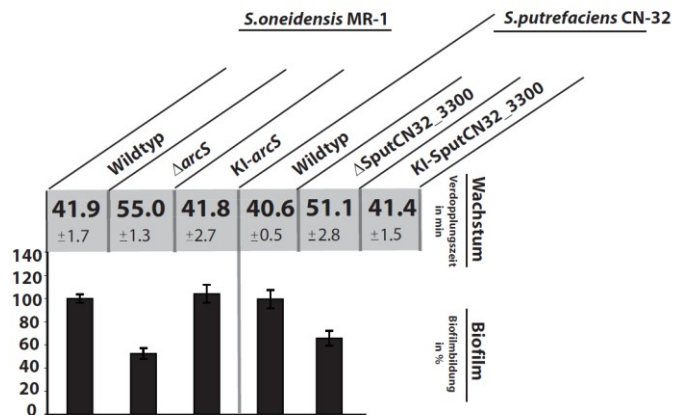


Abb.30: **Phänotypische Untersuchung von Δ SputCN32_3300**

Die Abbildung zeigt Wachstumsgeschwindigkeiten und Biofilmbildung von $\Delta arcS$ und Δ SputCN32_3300 sowie von den zugehörigen Wildtypstämmen. Oben: Dargestellt ist das Wachstum als Verdopplungszeit in LB. Dabei führt die Deletion sowohl von $arcS$ als auch von SputCN32_3300 zu einer Erhöhung der Verdopplungszeit verglichen mit dem Wildtyp. Unten: Dargestellt ist die Biofilmbildung normalisiert auf planktonisches Wachstum und den Wildtyp in % im MTP-Assay. Sowohl $\Delta arcS$ als auch Δ SputCN32_3300 zeigen dabei eine deutliche Reduktion der Biofilmbildung gegenüber dem Wildtyp..

Vergleicht man die Verdopplungszeiten von *S. oneidensis* MR-1 und *S. putrefaciens* CN-32 in LB (Abb. 30), so verhalten sich die beiden Wildtypen mit 41,9 min und 40,6 min sehr ähnlich. Ebenso führt die Deletion von $arcS$ und SputCN32_3300 zu einer analogen Verlangsamung des Wachstums gegenüber dem Wildtyp (Verdopplungszeit: +31% in $\Delta arcS$; +26% in Δ SputCN32_3300). Der Biofilm reduziert sich verglichen mit dem korrespondierenden Wildtyp in $\Delta arcS$ um ca. 50% und in Δ SputCN32_3300 um ca. 40%.

Unsere Untersuchungen zeigen für $\Delta arcS$ und Δ SputCN32_3300 sowohl im Wachstum als auch im Biofilm einen vergleichbaren Phänotyp. Es ist daher wahrscheinlich, dass auch andere orthologe Proteine zu ArcS im Genus *Shewanella* über die Sequenzähnlichkeiten hinaus funktional konserviert sind. Zusätzlich dazu ist das Vorhandensein von $arcA$ und $hptA$ in allen sequenzierten *Shewanella* Genomen ein Indiz für einen konservierten Signaltransduktionsmechanismus analog zum Typus von *S. oneidensis* MR-1.

5.1.7 Komplementationsanalysen an *S. oneidensis* MR-1 $\Delta arcS$ mit *E. coli* ArcB

Frühere Studien zeigten, dass, ähnlich wie bei *E. coli*, das *Shewanella* Arc-System Gene in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt der Umwelt reguliert (67, 75, 206). Es wird angenommen, dass *E. coli* ArcB dabei nicht primär Sauerstoff wahrnimmt, sondern auf den Redoxstatus zentraler Elektronentransporter der Atmungskette – Ubichinon und Menachinon – reagiert (13, 70, 142). Die Unterschiede im sensorischen Bereich zwischen ArcS und ArcB (Abb. 13) werfen die Frage auf, ob ArcS in ähnlicher Weise wie ArcB auf Redoxsignale reagiert. Für diesen Fall könnte ArcB aus *E. coli* fähig sein, Phänotypen von $\Delta arcS$ und/oder $\Delta hptA$ zu komplementieren.

Zur Untersuchung des mechanistischen Überlappungsbereiches zwischen ArcB und ArcS klonierte ich *E. coli arcB* unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors in pBAD33. Den resultierenden Vektor pBAD33- $arcB$ transformierte ich in *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp $\Delta arcS$, $\Delta arcS/\Delta hptA$ und $\Delta arcA$. Den Effekt einer Produktion von ArcB auf die entsprechenden Stämme testeten wir unter aeroben Bedingungen.

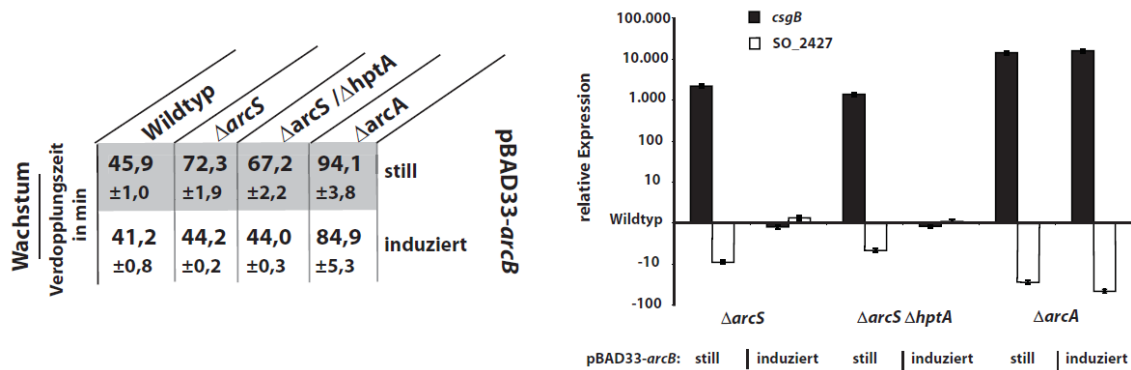


Abb. 31: Untersuchung von *E. coli* ArcB Produktionseffekten auf *S. oneidensis* MR-1 $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Produktion von *E. coli* ArcB auf das Wachstum und die Expression ausgewählter Gene von $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$ in LB. Links: Wachstum als die Verdopplungszeit in LB mit und ohne Induktion der Expression von *arcB*. Rechts: Genexpression ausgewählter in $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$ Gene als Vielfaches der Regulation bezogen auf den Wildtyp bestimmt durch qRT-PCR. Schwarze Balken geben dabei die Regulation von *csgB* an, weiße Balken repräsentieren die Regulation von SO_2427. Sowohl beim Wachstum als auch bei der Genexpression kann die Produktion von *E. coli* ArcB im $\Delta arcS$, $\Delta arcS/\Delta hptA$ und $\Delta arcA$ Hintergrund den Wildtypphänotypen wiederherstellen.

Interessanterweise führte die Induktion der Expression von *arcB* zur vollen Wiederherstellung der Wachstumsgeschwindigkeit des Wildtyps in $\Delta arcS$ und $\Delta arcS/\Delta hptA$ in LB (Abb. 31). Im Gegensatz dazu hatte die Expression von *arcB* in $\Delta arcA$ keine Auswirkung auf das Wachstum des Stammes. Zusätzlich zu den Wachstumsversuchen isolierte ich RNA aus den *arcB* exprimierenden Mutanten und bestimmte dort die Expression von *csgB* und SO_2427 bezogen auf den Wildtyp in einer qRT-PCR. Beide Gene wurden zuvor in den Transkriptomanalysen von $\Delta arcS$ und $\Delta arcA$ als positiv, beziehungsweise negativ reguliert identifiziert (67, 123). Wie schon beim Wachstum beobachtet, konnte die Produktion von *E. coli* ArcB in $\Delta arcS$ und $\Delta arcS/\Delta hptA$ das Expressionsniveau des Wildtyps wiederherstellen (Abb. 31). Eine Parallelstudie an ArcS (206) zeigte darüber hinaus, dass auch die Produktion von ArcS in Kombination mit HptA in $\Delta arcB$ sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen den Wildtypphänotypen wiederherstellen kann.

Demnach antworten trotz auffälliger, struktureller Unterschiede im sensorischen Bereich ArcS und ArcB auf das gleiche Signal und regulieren auf ähnliche Art und Weise die Aktivität von ArcA.

5.1.8 Phylogenetische Untersuchungen an ArcS

Das Paradigma Arc-System ist im Fall von *E. coli* intensiv untersucht worden. Dort besteht es aus den beiden Komponenten ArcB und ArcA (143). Für eine Vielzahl von γ -Proteobakterien, eingeschlossen *S. oneidensis* MR-1, wurde ein orthologer RR ArcA beschrieben (55, 69, 75, 135, 203). Über Sequenzähnlichkeiten lässt sich auch die zugehörige HK ArcB leicht identifizieren. Einzig für *Shewanella* findet man auf diese Weise ArcB nicht. Nur die Hpt HptA aus *S. oneidensis* MR-1 zeigt signifikante Homologien mit der carboxyterminalen Hpt-Domäne von ArcB (45% Sequenzidentität) (75). Untersuchungen im genetischen Umfeld von *hptA* zeigen eine auffällige Konservierung der Kontextgene stromaufwärts von *arcB* aus *E. coli* und *hptA* aus *S. oneidensis* MR-1 (Abb. 32).

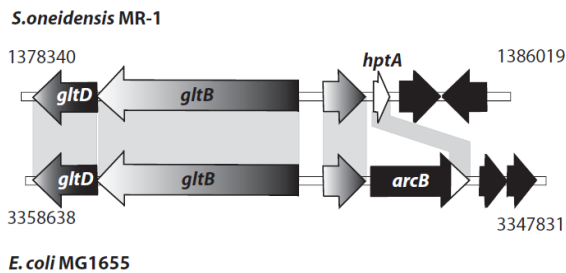


Abb.32: Bioinformatischer Vergleich der Genregionen von *hptA* und *arcB*

Die Abbildung zeigt das genetische Umfeld von *hptA* und *arcB*. Dabei ist der genetische Kontext stromaufwärts der beiden Gene gleich. Gradientenpfeile zeigen Gene, die in beiden Regionen konserviert sind. Der weiße Pfeile stellt *hptA* und die Pfeilspitze den 3'-Bereich von *arcB* dar. Schwarze Pfeile repräsentieren nicht-homologe Gene.

In beiden Fällen umfasst der konservierte Bereich stromaufwärts von *arcB* respektive *hptA* ein Gen, welches ein konserviertes hypothetisches Protein kodiert, sowie zwei weitere Gene *gltB* und *gltD*, welche Untereinheiten der Glutamatsynthese kodieren. Nicht überraschend formen HptA und seine orthologen Proteine auch einen phylogenetischen Ast mit den als ArcB annotierten Hybrid-HKs anderer γ -Proteobakterien (Abb. 33B). Die wahrscheinlichste Erklärung für dieses Phänomen ist, dass der verbleibende Teil ArcBs von *Shewanella*, welcher die PAS-Domäne, die Kinase-Domäne und die Empfängerdomäne enthält, entweder an eine andere Stelle im Genom relokalisiert wurde oder aber durch chromosomale Rekombinationsereignisse verloren ging und eine nichthomologe HK an seine Stelle trat. Für den ersten Fall müsste ArcS signifikante Homologien zu anderen ArcB Proteinen zeigen, jedoch fällt ArcS in eine distinkte phylogenetische Gruppe. Damit deutet alles auf einen Verlust der ursprünglichen HK ArcB und die Rekonstituierung eines funktionalen Arc-Systems aus ArcS, HptA und ArcA in *S. oneidensis* MR-1.

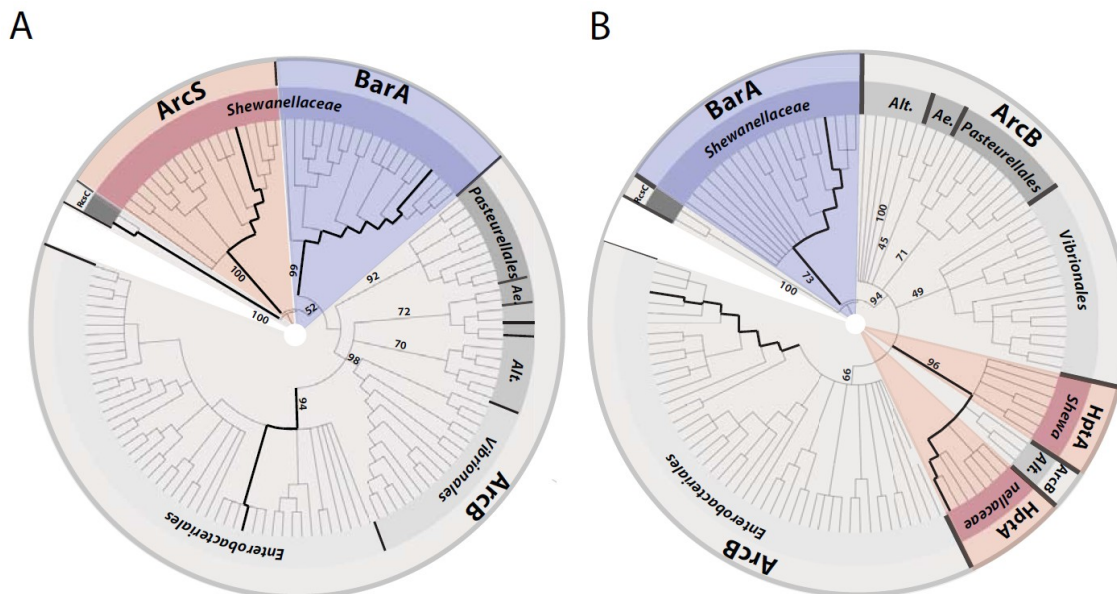


Abb. 33: Phylogenetische Untersuchungen an HptA und ArcS

Die Abbildung zeigt die phylogenetische Analyse der Kinase-Region von ArcS (A) und von HptA (B). Dabei wurden die entsprechenden Sequenzen der Proteine gegeneinander abgeglichen. BarA und RcsC aus *Shewanella* wurden als phylogenetische Randgruppen in unsere Untersuchungen mit einbezogen. Die fettgedruckten Linien zeigen die Positionen von *S. oneidensis* MR-1 RcsC, ArcS, BarA und *E. coli* ArcB der Reihenfolge nach im Uhrzeigersinn. In (B) sind die Positionen von ArcS und BarA vertauscht. Die Zahlen stehen für die Bootstrapwerte der einzelnen Äste. ArcS-Proteine sind rot markiert, BarA-Proteine blau. Alt: *Alteromonadales* Ae: *Aeromonadales*

5.1.9 *In vitro* Interaktionsuntersuchungen mit ArcS Mutanten

Das *Shewanella* Arc-System besteht im Gegensatz zu *E. coli* nicht nur aus den zwei Komponenten ArcB (HK) und ArcA (RR), sondern aus den drei Komponenten ArcS (HK), HptA (Hpt) und ArcA (RR). Die beiden letztgenannten Komponenten sind dabei wahrscheinlich evolutive Relikte des ursprünglichen Arc-Systems, wie es z.B. in *E. coli* vorkommt. ArcS hingegen stellt mit seiner für ArcB-Proteine ungewöhnlichen Domänenstruktur einen Sonderfall dar (Abb. 13). Zwar verhalten sich ArcS und ArcB funktionell gleich (123, 206), doch das Vorhandensein einer zusätzlichen PAS-Domäne im sensorischen Bereich und einer zusätzlichen Empfängerdomäne im katalytischen Bereich von ArcS legen Unterschiede in der Regulation der Proteinaktivität nahe.

Vergleicht man die beiden Empfängerdomänen mit bioinformatischen Methoden, so findet man die Sequenzen der carboxyterminalen Empfängerdomäne (RecII; aa: 1115-1229) von ArcS aus *S. oneidensis* MR-1 mit der *E. coli* ArcB Empfängerdomäne zu 41% identisch. Die andere ArcS-Empfängerdomäne (RecI; aa: 970-1088) hingegen zeigt nur eine Sequenzidentität von 26% und auch untereinander sind RecI und RecII nur zu 30% identisch. Aus diesen bioinformatischen Ergebnissen leiten sich zwei Vermutungen ab. Zum Ersten hat sich RecI nicht aus RecII dupliziert, sondern ist evolutionär unabhängig von ihm erworben worden. Zum Zweiten bedingen die deutlichen Sequenzunterschiede auch Veränderungen im Interaktionsverhalten zwischen der jeweiligen Empfängerdomäne und HptA.

Ein solches verändertes Interaktionsverhalten sollte sich auch in einer Phosphogruppentransferanalyse mutierter Versionen von ArcS nachweisen lassen. Um nun genau zu bestimmen, auf welchen aa-Rest von ArcS phosphoryliertes HptA seine Phosphorylgruppe überträgt, reinigte ich ArcS mit Mutationen im putativen katalytischen Aspartat von RecI (ArcS-RecI_{D1017N}) und RecII (ArcS-RecII_{D1162N}), sowie die korrespondierende Doppelmutation (ArcS-RecI+II_{D1017/1162N}) auf. Eine verbleibende Kinaseaktivität schloss ich durch Einführung einer zusätzlichen Substitution des katalytischen Histidins His₇₃₁ zu Ala in den drei ArcS-Proteinen ^{H731A}ArcS-RecI_{D1017N}, ^{H731A}ArcS-RecII_{D1162N} und ^{H731A}ArcS-RecI+II_{D1017/1162N} aus. Wie bereits gezeigt, überträgt ArcA seine Phosphorylgruppe auf HptA_{H62} (Abb. 29). Kombiniert man phosphoryliertes ArcA mit HptA und ^{H731A}ArcS-RecI+II_{D1017/1162N}, so akkumuliert kein radioaktives Signal auf ArcS. Im Gegensatz dazu kann man nach Austausch von ^{H731A}ArcS-RecI+II_{D1017/1162N} durch ^{H731A}ArcS-RecI_{D1017N} oder ^{H731A}ArcS-RecII_{D1162N} ein radioaktives Signal auf ArcS detektieren. Damit interagieren beim reversen Phosphogruppenfluss beide Empfängerdomänen mit HptA. Jedoch gibt es deutliche Unterschiede zwischen ^{H731A}ArcS-RecI_{D1017N} und ^{H731A}ArcS-RecII_{D1162N}. So ist beim Phosphogruppentransfer auf ^{H731A}ArcS-RecI_{D1017N} keine HptA-Bande mehr detektierbar (Abb. 34), wohingegen beim Transfer auf ^{H731A}ArcS-RecII_{D1162N} die Intensität von HptA (39,2%) verglichen mit einer Inkubation ohne ArcS (42,5%) oder mit ^{H731A}ArcS-RecI+II_{D1017/1162N} (45,5%) nur leicht abnimmt. Wie erwartet scheint also RecII (Abb. 13) deutlich besser mit HptA interagieren zu können als RecI.

Interessant ist außerdem der Vergleich der Signalintensitäten von ArcS. Bei einer Inkubation mit ^{H731A}ArcS-RecII_{D1162N} liegt der prozentuale Anteil von ArcS bei 33,0%. Inkubiert man mit ^{H731A}ArcS-

RecI_{D1017N}, zeigt ArcS eine prozentuale Intensität von 43,8%. Addiert man diese beiden ArcS-Intensitäten miteinander, so korrespondiert die Summe sowohl mit der Signalintensität von ArcS (70,1%) als auch von ArcS-HK_{H731A} (65,3%). Damit akkumuliert die Phosphorylgruppe von HptA zu ca. 40% auf RecI und zu ca. 60% auf RecII. Betrachtet man jetzt noch die prozentuale und absolute Bandenintensität von ArcA, so fällt auf, dass die Signalintensität gemessen nach der Inkubation mit ^{H731A}ArcS-RecII_{D1162N} deutlich stärker ist als die Intensität gemessen nach der Inkubation mit ^{H731A}ArcS-RecI_{D1017N}. Möglicherweise kann also die Phosphogruppe zwischen RecII und ArcA über HptA frei übertragen werden, wohingegen RecI nur als Phosphogruppenempfänger fungiert.

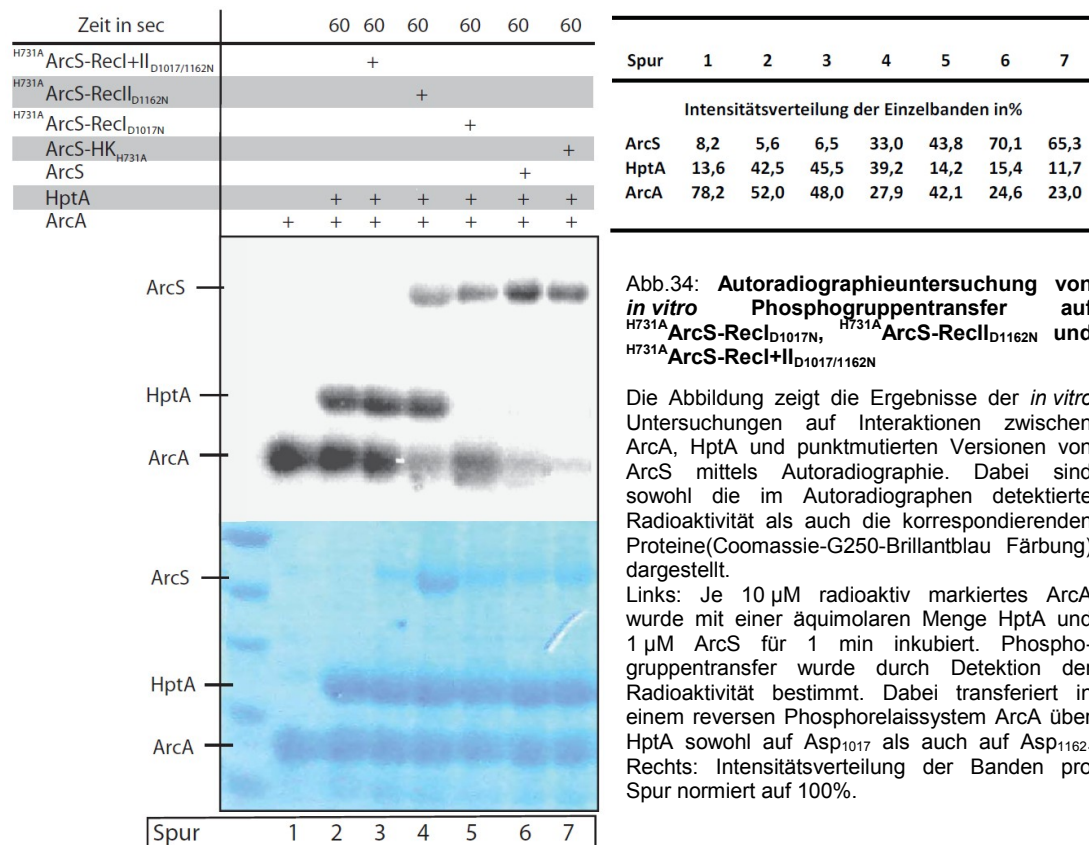


Abb.34: **Autoradiographieuntersuchung von *in vitro* Phosphogruppentransfer auf ^{H731A}ArcS-RecI_{D1017N}, ^{H731A}ArcS-RecII_{D1162N} und ^{H731A}ArcS-RecI+II_{D1017/1162N}**

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen auf Interaktionen zwischen ArcA, HptA und punktmutierten Versionen von ArcS mittels Autoradiographie. Dabei sind sowohl die im Autoradiographen detektierte Radioaktivität als auch die korrespondierenden Proteine (Coomassie-G250-Brillantblau Färbung) dargestellt.

Links: Je 10 µM radioaktiv markiertes ArcA wurde mit einer äquimolaren Menge HptA und 1 µM ArcS für 1 min inkubiert. Phosphogruppentransfer wurde durch Detektion der Radioaktivität bestimmt. Dabei transferiert in einem reversen Phosphorelaisystem ArcA über HptA sowohl auf Asp₁₀₁₇ als auch auf Asp₁₁₆₂. Rechts: Intensitätsverteilung der Banden pro Spur normiert auf 100%.

5.1.10 *In vivo* Analyse von *S. oneidensis* MR-1 mit Mutationen in ArcS und ArcA

In vitro Interaktionsanalysen (Abb. 29 und 34) identifizierten einen Phosphogruppenübertrag von ArcA_{D54} über HptA_{H62} auf ArcS-RecI_{D1017N} und ArcS-RecII_{D1162N}. Um die Bedeutung dieser Reste im Arc-System von *S. oneidensis* MR-1 *in vivo* zu untersuchen, komplementierte ich die Stämme $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$ sowohl entopisch als auch ektopisch mit punktmutierten Versionen von *arcA*, *hptA* und *arcS*. Dabei veränderte ich die Gene so, dass *arcA* für ArcA_{D54N} und ArcA_{D54E}, *hptA* für HptA_{H62A} und *arcS* für ArcS-RecI_{D1017N}, ArcS-RecII_{D1162N} und ArcS-RecI+II_{D1017/1162N} kodiert. Darüber hinaus mutierte ich *arcS* zusätzlich in dem für das katalytisch aktive His₇₃₁ kodierende Triplet. Die resultierenden Stämme KI-*arcA*_{D54N}, KI-*arcA*_{D54E}, KI-*hptA*_{H62A}, KI-*arcS*-HK_{H731A}, KI-*arcS*-RecI_{D1017N}, KI-*arcS*-RecII_{D1162N}, und KI-*arcS*-RecI+II_{D1017/1162N} untersuchte ich anschließend im Wachstum und in der Genexpression.

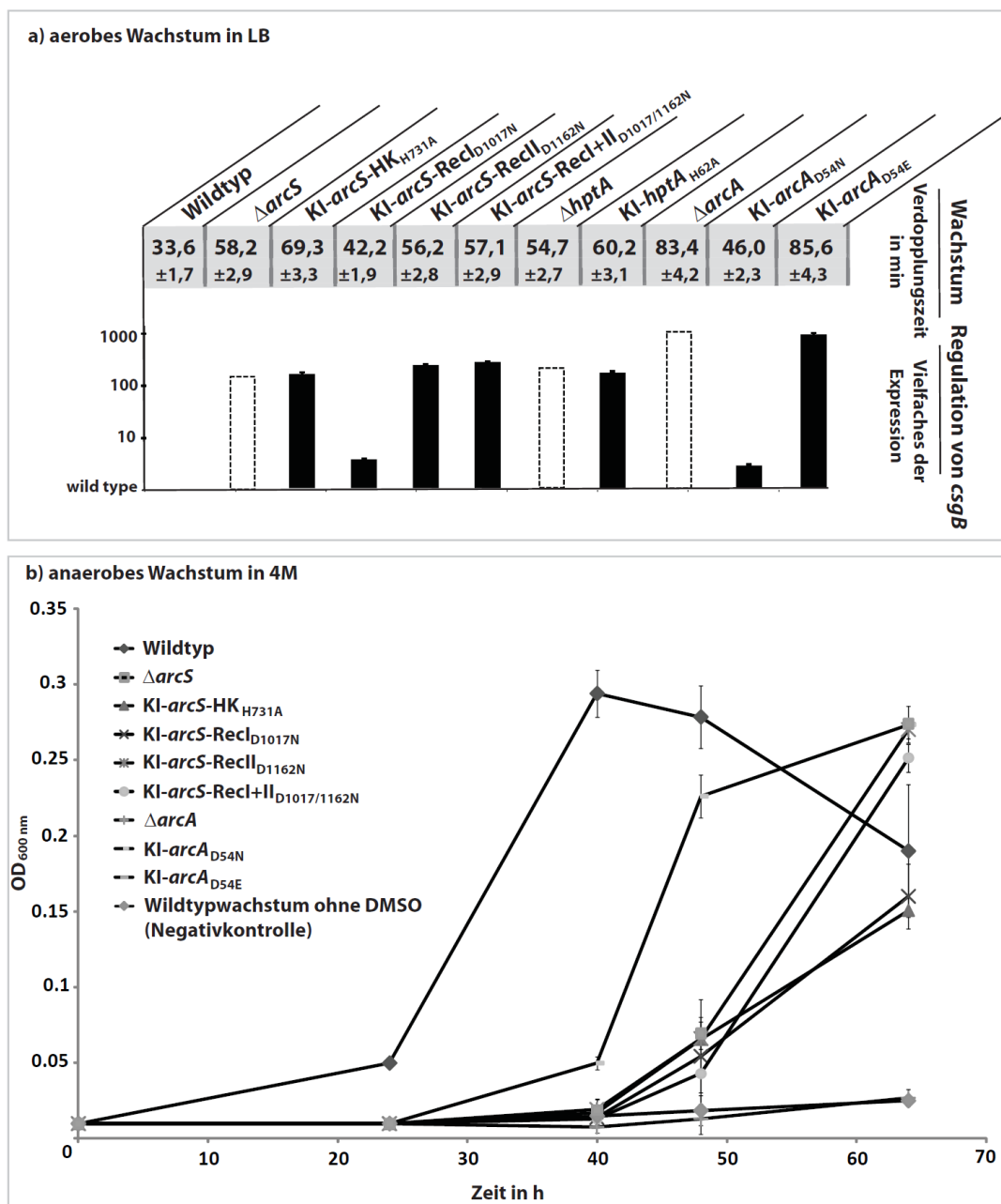


Abb. 35: *In vivo* Analyse von Punktmutationen in Komponenten des Arc-Systems von *S. oneidensis* MR-1

Die Abbildung zeigt die phänotypische Analyse von *S. oneidensis* MR-1 Stämmen mit Punktmutationen in Genen, die für Komponenten des Arc-Systems kodieren. a) Phänotypische Analyse aerob logarithmisch wachsender Zellen in LB. Dabei zeigt die Tabelle Wachstumsgeschwindigkeiten als Verdopplungszeiten während des exponentiellen Wachstums in LB an. Das Balkendiagramm darunter zeigt die korrespondierende Regulation von *csgB* als Vielfaches der Expression des Wildtyps ermittelt in einer qRT-PCR. Schwarze Balken stellen Daten, ermittelt aus Analysen der Substitutionsmutanten, dar. Gestrichelte Balken stellen Daten dar, ermittelt aus Analysen der Deletionsmutanten. b) Wachstumskinetiken anaerob wachsender Zellen in 4M mit DMSO als terminalen Elektronenakzeptor.

In früheren Untersuchungen zeigten Δ*arcS*, Δ*hptA* und Δ*arcA* deutliche Wachstumsdefekte verglichen mit dem Wildtyp sowohl bei einer Kultivierung in Vollmedien wie LB (75, 123) als auch bei Anzucht in Minimalmedien wie 4M (67, 206). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen sind in diesem Versuch die Verdopplungszeiten aerob wachsender Zellen in LB bei Δ*arcS* (58,2 min), Δ*hptA* (54,7 min) und Δ*arcA* (83,4 min) gegenüber dem Wildtyp (33,6 min) deutlich erhöht (Abb. 35a). Darüber hinaus zeigt ebenso KI-*hptA*_{H62A} (60,2 min) eine der korrespondierenden Deletionsmutante Δ*hptA* vergleichbare Verdopplungszeit sowie ähnliche Effekte in der Expression von *csgB*. Die Bedeutung des

konservierten HptA_{H62} wurde bereits *in vitro* demonstriert (Abb. 29). Meine phänotypische Charakterisierung von KI-*hptA*_{H62A} bestätigt damit *in vivo* die Beteiligung des konservierten aa-Restes im Phosphogruppentransfer zwischen ArcA und ArcS im Arc-System von *S. oneidensis* MR-1.

Im Falle von ArcA ist der Phänotyp stark von der jeweils produzierten ArcA-Mutation abhängig. So komplementiert KI-*arcA*_{D54N} sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen die durch einen Verlust von *arcA* hervorgerufenen Effekte (Abb. 35). Im Gegensatz dazu zeigt KI-*arcA*_{D54E} unter aeroben und anaeroben Bedingungen einen Phänotyp vergleichbar mit Δ *arcA*. Die phänotypischen Unterschiede zwischen KI-*arcA*_{D54N} und KI-*arcA*_{D54E} beruhen daher wahrscheinlich auf Änderungen der Konformation von ArcA, die zumindest im Falle von ArcA_{D54N} eine partielle Bindung an die DNA ermöglicht und so z.B. die Expression von *csgAB* unterdrückt (Abb. 35).

Ebenso wie bei Stämmen, die mutiertes ArcA produzieren, variiert auch der Phänotyp von KI-*arcS*-HK_{H731A}, KI-*arcS*-RecI_{D1017N}, KI-*arcS*-RecII_{D1162N}, und KI-*arcS*-RecI+II_{D1017/1162N}. In *E. coli* wird die γ -Phosphogruppe aus ATP in einer Autophosphorylierungsreaktion wahrscheinlich an das konservierte ArcB-HK_{H292} gebunden (143) und bildet somit den Startpunkt für den Phosphogruppenübertrag über ArcB-Rec_{D576} und ArcB-Hpt_{H717} auf ArcA_{D54}. In *S. oneidensis* MR-1 ist ArcS-HK_{H731} das Analogon zu *E. coli* ArcB-HK_{H292}. Und in der Tat zeigten meine *in vitro* Untersuchungen (Abb. 29) eine Autophosphorylierung am ArcS-HK_{H731} durch ATP. Untersucht man die Auswirkungen dieser Substitution *in vivo*, so, können ArcB-HK_{H731A} weder unter anaeroben Bedingungen noch unter aeroben Bedingungen die Wachstumsdefekte von Δ *arcS* komplementieren (Abb. 35) und das obwohl in Anwesenheit von Sauerstoff bei *E. coli* ein reverser ArcB-HK_{H292} unabhängiger Phosphogruppenfluss postuliert wird (68, 142). Mehr noch, die Effekte auf das Wachstum von *S. oneidensis* MR-1 verursacht durch ArcS-HK_{H731A} übertreffen sogar noch den Wachstumsdefekt von Δ *arcS*. Damit scheint in Übereinstimmung mit früheren Studien (97) *in vivo* das konservierte ArcS-HK_{H731} sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen eine Rolle zu spielen.

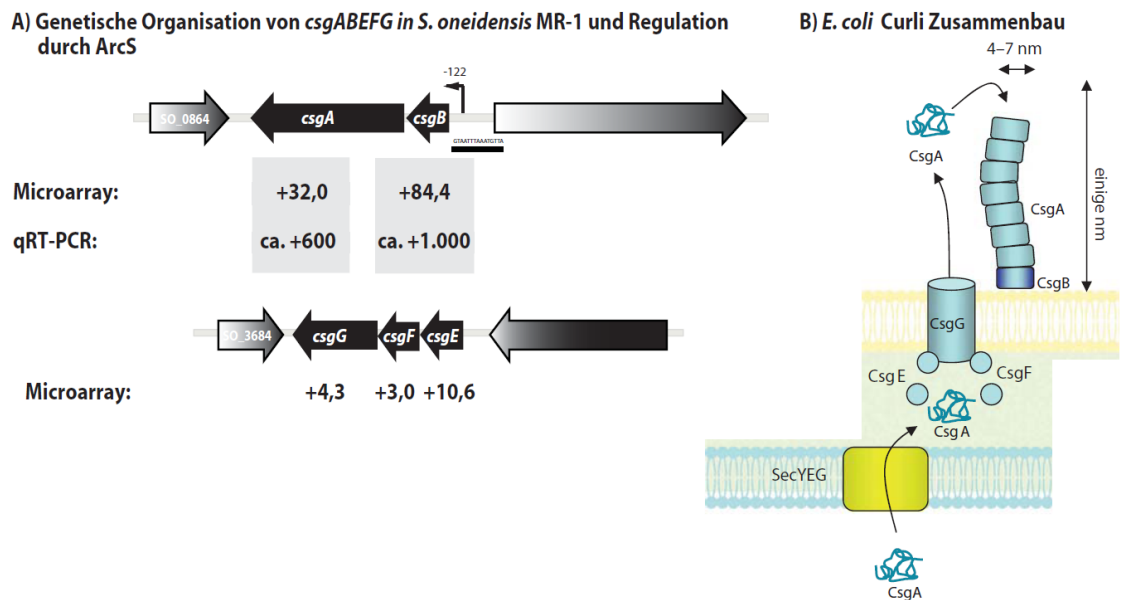
Meine Phosphogruppentransferanalysen zeigten *in vitro* einen reversen Phosphogruppenfluss sowohl auf ArcS-RecI_{D1017} als auch auf ArcS-RecII_{D1162} (Abb. 34). Dabei scheint jedoch ArcS-RecII_{D1162} gegenüber ArcS-RecI_{D1017} deutlich bevorzugt durch HptA_{H62} bedient zu werden. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis kann weder unter aeroben noch anaeroben Bedingungen KI-*arcS*-RecII_{D1162N} den Wachstumsdefekt von Δ *arcS* komplementieren (Abb. 35). KI-*arcS*-RecI_{D1017N} hingegen komplementiert/komplementiert nicht den Wachstumsdefekt von Δ *arcS* in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt (Abb. 35). So hat die Substitution von ArcS-RecI_{D1017} zu Asparagin nur geringen Einfluss auf das aerobe Wachstum von KI-*arcS*-RecI_{D1017N} verglichen mit dem Wildtyp und komplementiert die Expression von *csgAB* nahezu vollständig. Unter anaeroben Bedingungen jedoch ist der Wachstumsdefekt von KI-*arcS*-RecI_{D1017N} dem von KI-*arcS*-HK_{H731A} vergleichbar und damit deutlich schwerwiegender als von Δ *arcS* und KI-*arcS*-RecII_{D1162N}. Substituiert man allerdings sowohl ArcS-RecI_{D1017} als auch ArcS-RecI_{D1162} so ist der Phänotyp von KI-*arcS*-RecI+II_{D1017/1162N} stets dem von KI-*arcS*-RecII_{D1162N} und Δ *arcS* vergleichbar. Damit scheint für den Phosphogruppentransfer von ArcS auf ArcA eher ArcS-RecII_{D1162} eine Rolle zu spielen. Im Gegensatz dazu könnte über den

Phosphorylierungsgrad von ArcS-RecI_{D1017} die Funktionalität von ArcS als Kinase oder Phosphatase beeinflusst werden.

Entwicklung einer transkriptionalen Reporterfusion

Zur Analyse der Genregulation durch das *S. oneidensis* MR-1 Arc-System bezog ich in vorangegangenen Versuchen Expressionsdaten für die Gene *csgAB* ein. Wie bereits unter 9.1.4 diskutiert, kodieren *csgAB* für die Strukturgene der Curli CsgAB (Abb. 36) und zählen zu den am stärksten durch das Arc-System regulierten Genen. Darüber konnte bioinformatisch eine DNA-Bindestelle für ArcA stromaufwärts der Gene identifiziert und die Bindung von ArcA in dieser Region biochemisch gezeigt werden (67). Der Promotor von *csgAB* eignet sich daher hervorragend für eine transkriptionale Fusion mit *luxCDABE*. Zur Konstruktion von *S. oneidensis* MR-1 Reporterstämmen wurden 545 bp stromaufwärts des Startkodons von *csgA* in den Vektor pNPTS138-R6KT-Lux (S.P. Bubendorfer unveröffentlicht) kloniert und mittels einfacher homologer Rekombination in das Genom von *S. oneidensis* MR-1 integriert. Diese Integration von pNPTS138-R6KT-Lux-*PcsgAB* führt zur Zerstörung des natürlichen Expressionsprofils von *csgAB*. Aus diesem Grunde wurden in Zusammenarbeit mit Anna-Lena Henche Effekte von $\Delta csgAB$ auf aerobes Wachstum ausgeschlossen (82).

Als Zusatzinformation möchte ich an dieser Stelle erwähnen, dass sich weder in *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp noch in $\Delta arcA$ (die Expression von *csgAB* ist in diesem Stamm um Faktor 19.000 erhöht vgl. Abb. 19 und 35) – elektronenmikroskopisch Curli nachweisen lassen (Daten nicht gezeigt).



verändert nach (65)

Abb. 36: Genetische Organisation von *csgABEFG* in *S. oneidensis* MR-1 und Regulation durch ArcS

Die Abbildung zeigt die genetische Organisation von *csgABEFG* in *S. oneidensis* MR-1 sowie den Zusammenbau der Curli in *E. coli*. A) Genetische Organisation von *csgABEFG* und zugehörige im Microarray oder der qRT-PCR ermittelte Expression verglichen mit dem Wildtyp als Vielfaches B) Curli-Zusammenbau in *E. coli*: Transport von CsgA mit dem SecYEG-System über die innere Membran von dort durch das Periplasma und die äußere Membran mittels CsgEFG. Dann erfolgt die Assemblierung des Curli aus CsgA und CsgB extrazellulär.

Nach Integration von pNPTS138-R6KT-Lux-PcsgAB in das Genom von *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp, $\Delta arcS$, $\Delta arcA$, KI-*arcS*-HK_{H731A}, KI-*arcS*-RecI_{D1017N}, KI-*arcS*-RecII_{D1162N}, sowie KI-*arcS*-RecI+II_{D1017/1162N} (Abb. 36), untersuchte ich die Chemolumineszenz aerob wachsender Stämme in LB. Die Expression von *csgAB* ist dabei direkt proportional zur detektierten Chemolumineszenz.

Zellen des Wildtyps emittierten während des gesamten Wachstums keine über das Hintergrundsignal hinausgehende Chemolumineszenz (Abb. 37). Im Gegensatz dazu gaben $\Delta arcS$ und $\Delta arcA$ während des exponentiellen Wachstums Chemolumineszenz von ca. 25.000 relativen Lichteinheiten (rlu) respektive ca. 250.000 rlu ab. Vergleiche mit den korrespondierenden *csgB* Expressionsdaten zeigen eine tendenzielle Übereinstimmung. Mehr noch, der 10fache Unterschied in der Expression von *csgB* zwischen $\Delta arcA$ und $\Delta arcS$ (Abb. 35), findet sich ebenso in der ermittelten Chemolumineszenz für die korrespondierenden Reporterstämme (Abb. 37). Damit stellt die transkriptionale Fusion von PcsgAB mit *luxCDABE* eine schnelle und einfache Methode dar, Mutationen in Komponenten des Arc-Systems zu analysieren und auf biologische Relevanz hin zu überprüfen.

Schaut man sich die Chemolumineszenz exponentiell wachsender Zellen von KI-*arcS*-HK_{H731A}, KI-*arcS*-RecI_{D1017N}, KI-*arcS*-RecII_{D1162N}, sowie KI-*arcS*-RecI+II_{D1017/1162N} an (Abb. 36) so spiegelt sich darin die in der qRT-PCR ermittelte Expression von *csgB* wider. In der stationären Phase verhalten sich die Stämme in der abgegebenen Lumineszenz dem Trend nach ähnlich wie beim exponentiellen Wachstum, jedoch nimmt die Signalintensität um bis zu Faktor 10 zu. Möglicherweise ist hierfür eine Akkumulation von LuxCDABE verantwortlich, da auch im Falle einer Deletion von *arcA* das gleiche Phänomen beobachtet werden kann. Jedoch kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass ein zusätzlicher Transkriptionsfaktor die Expression von *csgAB* in der stationären Phase stimuliert oder dass der beobachtete Effekt zumindest z.T. die entsprechende Mutation als Ursache hat. So könnte die bei KI-*arcS*-RecI_{D1017N} gemessene Lumineszenz (Abb. 37) durchaus Hinweis auf eine besondere Bedeutung von ArcS-RecI_{D1017} sein, weil möglicherweise gerade hier eine Feinjustierung der Kinaseaktivität von ArcS notwendig wird.

In den neu entwickelten Reporterassay schloss ich eine Mutationsanalyse der sensorischen PAS-Domänen mit ein. Dazu deletierte ich unabhängig voneinander beide PAS-Domänen und integrierte verkürzten Versionen von *arcS* in das Genom von *S. oneidensis* MR-1. Darüber hinaus substituierte ich ArcS-PASI_{C483} mit Alanin. Bei Sequenzvergleichen mit der PAS-Domäne aus ArcB_{E. coli} wird dieses ArcS-PASI_{C483} interessanterweise dem ArcB-PAS_{C180} zugeordnet. ArcB-PAS_{C180} wiederum ist in *E. coli* hauptverantwortlich für die Stilllegung der Kinaseaktivität von ArcB (142).

In die resultierenden Stämme KI-*arcS*-PASI₄₆₄₋₅₇₃, KI-*arcS*-PASII₅₉₄₋₆₉₈ und, KI-*arcS*_{C483A} wurde ebenso die *luxCDABE*-Kassette integriert und die Chemolumineszenz in Abhängigkeit von der Wachstumsphase bestimmt. Dabei verhalten sich sowohl KI-*arcS*-PASI₄₆₄₋₅₇₃ als auch KI-*arcS*_{C483A} wie der Wildtyp (Abb. 36). Unter den getesteten Bedingungen scheint also ArcS-PASI₄₆₄₋₅₇₃ keine entscheidende Rolle für die Regulierung der physiologischen Aktivität von ArcS zu spielen. Ganz anders verhält sich KI-*arcS*-PASII₅₉₄₋₆₉₈. Die hier detektierte Chemolumineszenzintensität ist vergleichbar der Intensität gemessen in $\Delta arcS$. So hat interessanterweise unter aeroben Wachstumsbedingungen ArcS-

PASII₅₉₄₋₅₇₃ Einfluss auf die physiologische ArcS-Aktivität, die keinerlei Homologien zur *E. coli* ArcB-PAS-Domäne zeigt (Abb. 13).

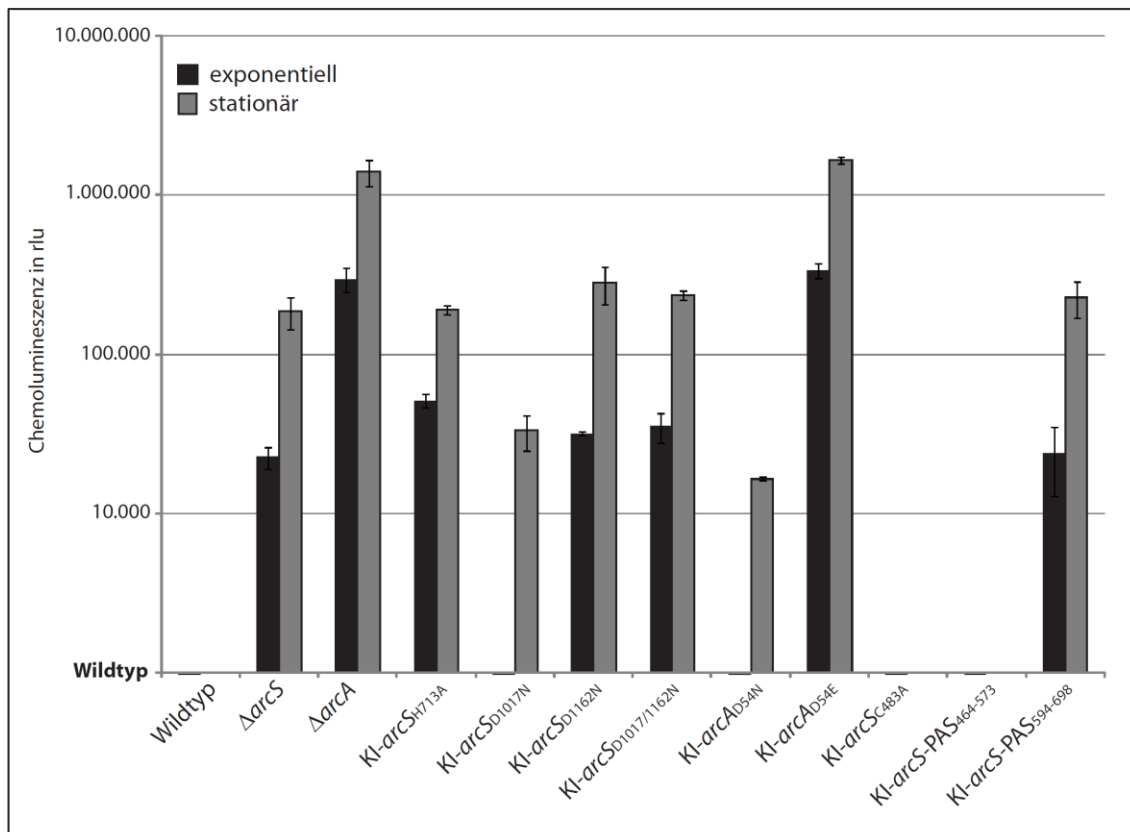


Abb. 37: *In vivo* Analyse chromosomal integrierter Mutationen in *S. oneidensis* MR-1 *arcS* und *arcA*

Die Abbildung zeigt die durch LuxCDABE erzeugte Chemolumineszenzintensität von *S. oneidensis* MR-1 in Abhängigkeit der jeweiligen chromosomal integrierten Mutation von *arcS* oder *arcA*. Dabei wurde der *P_{cs}gAB* als transkriptionale Fusion vor *luxCDABE* kloniert und in die Genome der entsprechenden Stämme integriert. Gemessen wurde dann die Chemolumineszenz aerob in LB kultivierter *S. oneidensis* MR-1 Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase (Schwarze Balken) und nach Erreichen der Plateauphase ($OD_{600nm} = 6,0$) (graue Balken). Dabei zeigen die jeweiligen Stämme in Abhängigkeit von der Mutation in *arcS* unterschiedlichste Chemolumineszenzintensitäten.

In vivo Analyse von Δ*arcS* nach Überproduktion von ArcS-Mutantenversionen

Die Analyse chromosomal verankerter Mutationen in *arcS* gibt Aufschluss über die Bedeutung von ArcS-HK_{H731}, ArcS-RecI_{D1017} und ArcS-RecII_{D1162} sowie die Rolle der PAS-Domänen. So scheint der Phosphogruppentransfer von und auf HptA_{H62} vorzugsweise über ArcS-RecII_{D1162} zu laufen. Die Phosphorylierung von ArcS-RecI_{D1017}, jedoch scheint eher die Aktivität der Kinase zu beeinflussen. Darüber hinaus spielt auch ArcS-HK_{H731} sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen eine besondere Rolle. Zur weiteren Charakterisierung des Regulationsmechanismus insbesondere von ArcS klonierte ich *arcS*, *arcS*-HK_{H731A}, *arcS*-RecI_{D1017N}, *arcS*-RecII_{D1162N} und *arcS*-RecI+II_{D1017/1162N} sowie *arcS*-PASII₄₆₄₋₅₇₃, *arcS*-PASII₅₉₄₋₆₉₈ und KI-*arcS*_{C483A} in den Vektor pBAD33-HisA (N. Hess unveröffentlicht). Der Vektor pBAD33-HisA ermöglicht eine kontrollierte Expression der klonierten Gene. Darüber hinaus erhalten alle Proteine aminoterminal einen His₆-Tag, der eine Detektion im Westernblot erlaubt.

Die gemessene Chemolumineszenz von pBAD33-HisA tragenden Zellen von *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp, $\Delta arcS$ und $\Delta arcA$ (Abb. 38) verhält sich unabhängig von der Zugabe von Arabinose vergleichbar der Lumineszenz ermittelt in den korrespondierenden Stämmen ohne Vektor (Abb. 36). Darüber hinaus reduziert sich in $\Delta arcS$ + pBAD33-HisA-*arcS* nach Induktion der Expression von *arcS* die Chemolumineszenz auf das Niveau des Wildtyps. Zusätzlich jedoch gibt es auch eine partielle Komplementation auch ohne Zugabe von Arabinose (Abb. 38). Eine Proteinkonzentration von ArcS unterhalb der Detektionsgrenze im Westernblot scheint also bereits auszureichen um zumindest teilweise in *S. oneidensis* MR-1 ein funktionales Arc-System wiederherzustellen.

Betrachtet man die Intensität der Lumineszenz der Stämme $\Delta arcS$ + pBAD33-HisA-*arcS*-RecII_{D1162N}, $\Delta arcS$ + pBAD33-HisA-*arcS*-RecI+II_{D1017/1162N} und $\Delta arcS$ + pBAD33-HisA-*arcS*-PASI₄₆₄₋₅₇₃ so ergeben sich Messwerte, die mit denen der korrespondierenden Stämme KI-*arcS*-RecII_{D1162N}, KI-*arcS*-RecI+II_{D1017/1162N} und KI-*arcS*-PASI₄₆₄₋₅₇₃ vergleichbar sind. Ein gegensätzliches Verhalten zeigen die Stämme $\Delta arcS$ + pBAD33-HisA-*arcS*-RecI_{D1017N} und KI-*arcS*-RecI_{D1017N}. Nach Induktion der Expression von *arcS*-RecI_{D1017N} sinkt die Intensität der Chemolumineszenz nicht wie bei KI-*arcS*-RecI_{D1017N} (Abb. 37) auf Wildtypniveau zurück sondern zeigt einen $\Delta arcS$ Phänotyp (Abb. 38). Interessanterweise kommt es aber ohne Induktion der Expression von *arcS*-RecI_{D1017N} zu einer partiellen Komplementation. Damit scheint besonders hier das Proteinlevel eine entscheidende Rolle zu spielen.

Mit anderen Worten: Überproduziert man ein ArcS, indem der Hauptempfänger (ArcS-RecII_{D1162N}) erhalten bleibt und zusätzlich der molekulare Schalter zwischen Kinase- und Phosphataseaktivität (ArcS-RecI_{D1017N}) in seiner unphosphorylierten Form die Phosphataseaktivität begünstigt, so würde ein unnatürlich hohes Proteinlevel wie eine Phosphatsenke wirken und ArcA ebenso über das natürliche Maß hinaus dephosphorylieren können. Die Mutante $\Delta arcS$ + pBAD33-HisA-*arcS*-RecI_{D1017N} simuliert (nach Induktion mit Arabinose) diesen Fall und die Analyse des Phänotypen von $\Delta arcS$ + pBAD33-HisA-*arcS*-RecI_{D1017N} deutet auf die Richtigkeit der Hypothese hin (Abb. 38).

Die Induktion der Expression von *arcS*-HK_{H731A} und *arcS*-PASI₄₆₄₋₅₇₃ führt zwar während des exponentiellen Wachstums mit KI-*arcS*-HK_{H731A}, respektive KI-*arcS*-PASI₄₆₄₋₅₇₃ vergleichbaren Chemolumineszenzen, während der stationären Phase jedoch steigt die Lumineszenzintensität auf das Niveau von $\Delta arcA$.

Die Substitution des katalytisch aktiven Histidins mit Alanin in *E. coli* EnvZ oder *Caulobacter crescentus* CckA (36, 87) zerstört zwar die Kinaseaktivität der HK, jedoch bleibt die Phosphataseaktivität erhalten. Damit könnte auch ArcS-HK_{H731A} seine Aktivität als Phosphatase erhalten haben. Diesen Fall vorausgesetzt würde die ArcA-Population über das native Maß hinaus dephosphoryliert, die ausgleichende Kinaseaktivität jedoch fehlt (Abb. 29). Im Gegensatz dazu verhindert eine Mutation im ArcS-RecII_{D1162N} (*arcS*-RecII_{D1162N} und *arcS*-RecI+II_{D1017/1162N}) lediglich einen Phosphogruppentransfer und nimmt keinen zusätzlichen Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad der ArcA-Population.

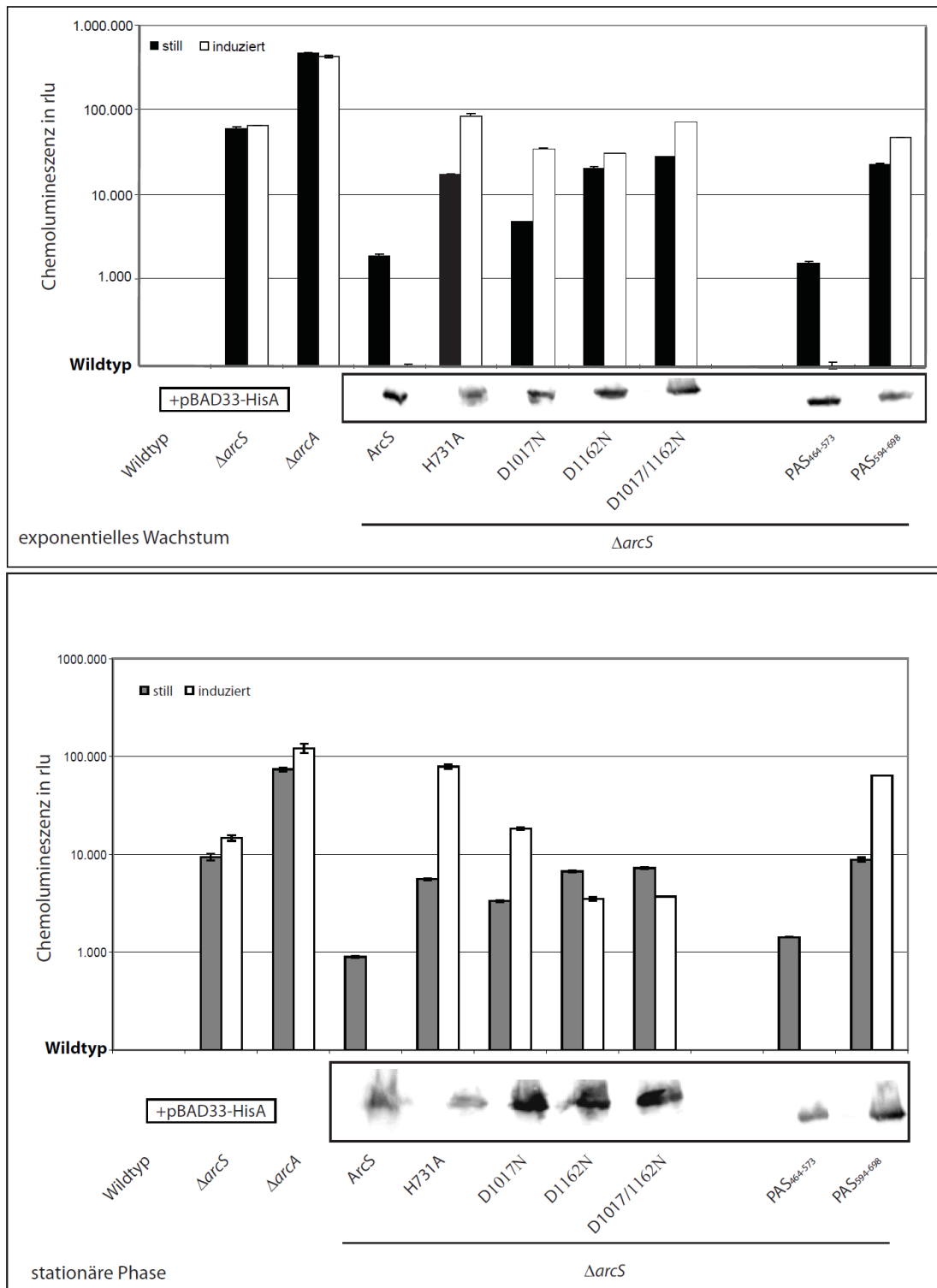


Abb. 38: **In vivo Analyse vektoriell kodierter mutierter *S. oneidensis* MR-1 *arcS* Versionen in $\Delta arcS$**

Die Abbildung zeigt die durch LuxCDABE erzeugte Chemolumineszenzintensität von *S. oneidensis* MR-1 in Abhängigkeit der jeweiligen Mutation von *arcS* oder *arcA*. Dabei wurde der *PcsgAB* als transkriptionale Fusion vor *luxCDABE* kloniert und in die Genome der entsprechenden Stämme integriert. Gemessen wurde dann die Chemolumineszenz aerob in LB kultivierter *S. oneidensis* MR-1 Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase (oben) und nach Erreichen der Plateauphase ($OD_{600nm} = 6,0$) (unten) mit (schwarze Balken) und ohne (graue Balken) Zugabe von final 0,2% Arabinose. Von links nach rechts tragen Wildtyp, $\Delta arcS$ und $\Delta arcA$ jeweils den Leervektor pBAD33-HisA. In allen weiteren Stämme wurde *arcS* deletiert und mit pBAD33-HisA-*arcS* oder einer entsprechend mutierten Version transformiert, die aus Gründen der Übersichtlichkeit in der Abbildung verkürzt dargestellt wurde (So steht z.B. D1017N für $\Delta arcS$ + pBAD33-HisA-*arcS*-RecD_{D1017N}). Im Kasten unterhalb des Diagramms ist die detektierte Proteinmenge mit und ohne Zugabe von Arabinose dargestellt). Dabei zeigen die jeweiligen Stämme in Abhängigkeit von der jeweiligen Mutation unterschiedlichste Chemolumineszenzintensitäten.

5.1.11 Regulation des Arc-Systems in *S. oneidensis* MR-1

Die *in vivo* Analyse von Mutanten im Arc-System zeigte eine Zunahme der Chemolumineszenzintensität stationärer Kulturen gegenüber exponentiell wachsenden Zellen (Abb. 37). Um zu untersuchen ob dieser Effekt auf einer erhöhten Expression der Gene *arcS*, *hptA* und *arcA* beruht, quantifizierte ich die mRNA exponentiell in LB wachsender *S. oneidensis* MR-1 Zellen ($OD_{600nm} = 0,6$ und $OD_{600nm} = 2,0$) und verglich sie mit der mRNA aus Zellen die sich im Übergang zur ($OD_{600nm} = 4,0$) oder bereits in der stationären Phase befanden ($OD_{600nm} = 6,0$) (Abb. 39).

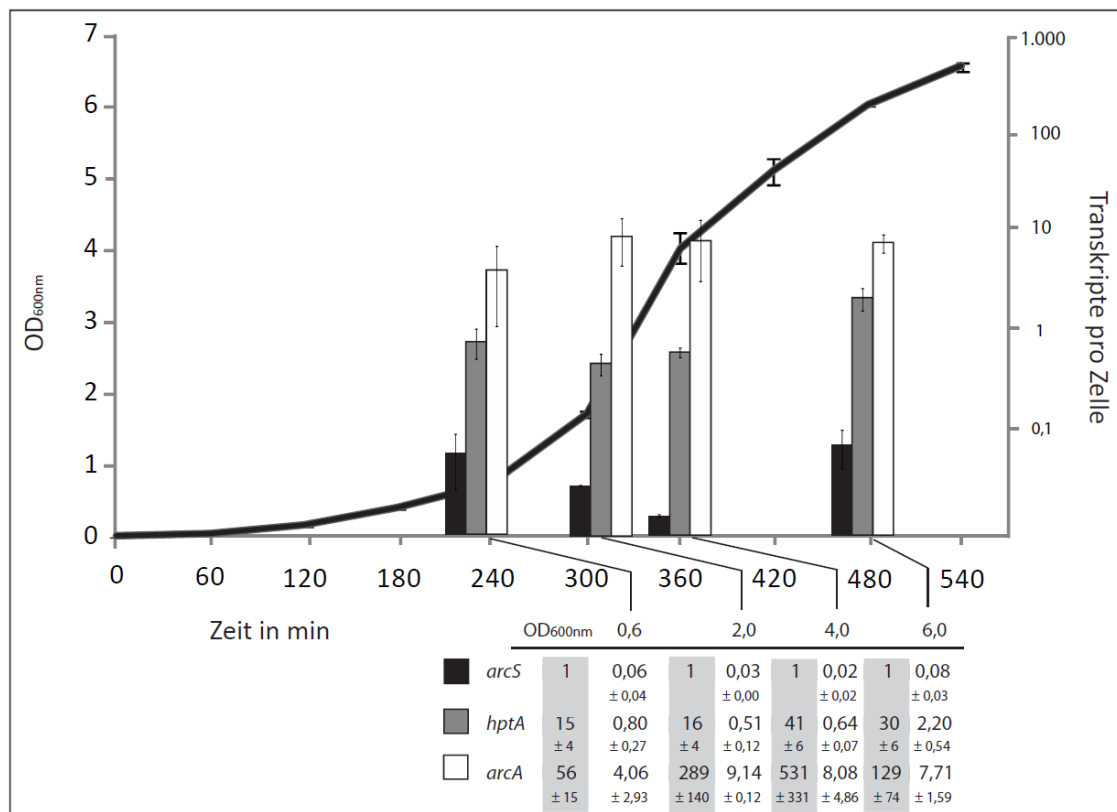


Abb. 39: **Quantitative Analyse des mRNA-Gehaltes von *arcS*, *hptA* und *arcA* in Abhängigkeit von der Wachstumsphase unter aeroben Bedingungen in LB** Die Abbildung zeigt die durch LuxCDABE erzeugte Chemolumineszenzintensität von *S. oneidensis* MR-1 in Abhängigkeit der jeweiligen Mutation von *arcS* oder *arcA*. Dabei wurde der *PcsgAB* als transkriptionale Fusion vor *luxCDABE* kloniert und in die Genome der entsprechenden Stämme integriert. Gemessen wurde dann die Chemolumineszenz aerob in LB kultivierter *S. oneidensis* MR-1 Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase (oben) und nach Erreichen der Plateauphase ($OD_{600nm} = 6,0$) (unten) mit (schwarze Balken) und ohne (graue Balken) Zugabe von final 0,2% Arabinose. Von links nach rechts tragen Wildtyp, $\Delta arcS$ und $\Delta arcA$ jeweils den Leervektor pBAD33-HisA. In allen weiteren Stämmen wurde *arcS* deletiert und mit pBAD33-HisA-*arcS* oder einer mutierten Version transformiert. Diese ist verkürzt benannt. Demnach steht D1017N für $\Delta arcS$ + pBAD33-HisA-*arcS*_{D1017N}. Im Kasten unterhalb des Diagramms ist die detektierte Proteinmenge mit und ohne Zugabe von Arabinose dargestellt. Dabei zeigen die jeweiligen Stämme in Abhängigkeit von der jeweiligen Mutation unterschiedlichste Chemolumineszenzintensitäten.

Dabei nimmt die Transkriptmenge sowohl von *arcS* (Faktor 2-3), *hptA* (Faktor 3-4) als auch *arcA* (Faktor 1,5-2) zur stationären Phase hin zu. Jedoch erfolgt die Zunahme der Transkriptmenge der mRNAs nicht synchron. So akkumuliert mRNA von *arcA* bereits in der spätexponentiellen Phase während sich die Transkriptmenge von *hptA* bzw. *arcS* erst im Übergang zur bzw. in der stationären Phase akkumuliert. Diese Asynchronität führt zu dramatischen Veränderungen im Verhältnis der mRNAs von *arcS*, *hptA* und *arcA* zueinander (Abb. 39). Sollte sich diese Verhältnisänderungen der mRNAs von *arcS*:*hptA*:*arcA* auch im Proteingehalt wiederfinden, könnte dadurch der Phosphorgruppenfluss

zwischen ArcS, HptA und ArcA verändert werden. Damit bietet sich eine zusätzliche Möglichkeit, die Genregulation durch das Arc-System von *S. oneidensis* MR-1 feinzustimmen.

Frühere Untersuchungen berichten über einen FNR-bedingten Anstieg der Transkriptmenge von *arcA* unter anaeroben Bedingungen in *E. coli* (39). *Shewanella* ArcA ist ebenso wie sein Ortholog in *E. coli* an der Genregulation in Abhängigkeit vom Sauerstoff beteiligt. Es wäre daher gut möglich, dass auch die Transkriptmenge von *S. oneidensis* MR-1 *arcA* unter anaeroben Wachstumsbedingungen zunimmt. Jedoch ließ sich weder mit DMSO noch Fumarat als terminalen Elektronenakzeptor bei Kultivierung in LB eine signifikante Veränderung der mRNA Menge von *arcS*, *hptA* oder *arcA* zu aerob wachsenden Zellen feststellen (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ist dies das Ergebnis einer gegenüber *E. coli* veränderten Rollenverteilung von EtrA (FNR) auf CRP (139, 196).

TCS-Proteine können in einer Feedbackschleife die Expression ihrer Gene regulieren. So reguliert PhoPQ die Expression von *mgrB*. MgrB wiederum inhibiert die Expression von *phoP* (128). Wenn es für *S. oneidensis* MR-1 eine ebensolche Feedbackregulation gibt, sollte eine Deletion in *arcS*, *hptA* oder *arcA* Einfluss auf die Expression der jeweils nicht deletierten Gene haben. qRT-PCR-Analysen von cDNAs – synthetisiert aus mRNA aerob in LB wachsender Zellen der Stämme $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcA$ – ergaben weder eine signifikante Veränderung der Transkriptmenge von *arcS/hptA* in $\Delta arcA$, noch von *hptA/arcA* in $\Delta arcS$ oder *arcS/arcA* in $\Delta hptA$ (Daten nicht gezeigt). Damit ist zumindest unter den getesteten Bedingungen eine Feedbackregulation auszuschließen.

5.2 Antwortregulator SO_4444

Das *Shewanella* Arc-System ist ein Beispiel für die Evolution regulatorischer Netzwerke durch strukturelle Veränderung bestehender Systeme. Unter Erhalt einiger Komponenten (ArcA, HptA) und Austausch anderer Komponenten (ArcB in *E. coli* mit ArcS in *S. oneidensis* MR-1) etablierte sich in Anpassung an die Umwelt ein neues System mit veränderter sensorischer und regulatorischer Kapazität. Orthologe Proteine zu ArcS, HptA und ArcA lassen sich über Sequenzvergleiche leicht in allen Mitgliedern des Genus *Shewanella* identifizieren und gehören so zum Kernsatz von TCS-Systemen innerhalb der Familie *Shewanellaceae*. Der RR SO_4444 hingegen lässt sich nur in den Genomen von *S. oneidensis* MR-1 und *S. baltica* OS223 identifizieren. Damit ist SO_4444 im Gegensatz zu ArcS, HptA und ArcS Bestandteil des variablen Satzes von Regulatoren. Der phylogenetische Ursprung von SO_4444 und seine physiologische Bedeutung für *S. oneidensis* MR-1 stehen im Fokus des zweiten Teils dieser Arbeit.

5.2.1 Phylogenetische Charakterisierung von SO_4444

Tabelle 5: TCS-Proteine im Genus *Shewanella* (<http://mistdb.com/>)

Spezies	Hybrid-HK	orthodoxe HK	HK	RR	TCS-Proteine	Genom in Mbp	Plasmide
<i>Shewanella amazonensis</i> SB2B	34	10	44	52	96	4,31	0
<i>Shewanella baltica</i> OS155	32	7	39	48	87	5,34	4
<i>Shewanella baltica</i> OS185	35	7	42	51	93	5,24	1
<i>Shewanella baltica</i> OS195	37	8	45	51	96	5,55	3
<i>Shewanella baltica</i> OS223	32	9	41	50	91	5,36	3
<i>Shewanella denitrificans</i> OS217	21	8	29	38	67	4,55	0
<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400	28	11	39	43	82	4,85	0
<i>Shewanella halifaxensis</i> HAW-EB4	27	9	36	42	78	5,23	0
<i>Shewanella loihica</i> PV-4	32	10	42	48	90	4,6	0
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	35	9	44	52	96	5,13	1
<i>Shewanella pealeana</i> ATCC 700345	26	10	36	45	81	5,17	0
<i>Shewanella piezotolerans</i> WP3	32	13	45	51	96	5,4	0
<i>Shewanella putrefaciens</i> CN-32	33	5	38	42	80	4,66	0
<i>Shewanella sediminis</i> HAW-EB3	40	14	54	61	116	5,52	0
<i>Shewanella</i> sp. ANA-3	32	12	44	52	96	5,25	1
<i>Shewanella</i> sp. MR-4	34	9	43	49	92	4,71	0
<i>Shewanella</i> sp. MR-7	33	9	42	48	90	4,8	1
<i>Shewanella</i> sp. W3-18-1	31	5	36	41	77	4,71	0
<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908	37	19	56	57	113	5,94	0

Die Zahl der TCS-Proteine im Genus *Shewanella* schwankt in Abhängigkeit von der Spezies zwischen 67 in *S. denitrificans* OS217 und 116 in *S. sediminis* HAW-EB3. Damit kann der Anteil des variablen Satzes an TCS-Proteinen mehr als 40% ausmachen und ist damit nicht unerheblich an der Anpassung an eine spezielle ökologische Nische beteiligt. Zu diesem variablen Satz gehört auch der RR SO_4444 in *S. oneidensis* MR-1. Sequenzvergleiche von SO_4444 identifizieren innerhalb des Genus *Shewanella* mit 92% Identität nur ein orthologes Protein: den RR Sbal223_0289. Interessanterweise findet man aber in *Aeromonas hydrophila* einen orthologen RR AHA_1023 (Identität 63%) (Abb. 44). Das wirft die Frage auf, ob die Gene SO_4444 und Sbal223_0289 über horizontalen Gentransfer aus *Aeromonas* transferiert worden. Ein Blick auf den genomischen Kontext von SO_4444, Sbal223_0289 und AHA_1023 zeigt, dass nicht nur die den RR kodierenden Gene in allen drei Spezies konserviert sind, sondern auch der entsprechende genetische Kontext (Abb. 39). Erweitert man die betrachtete genomische Region stromabwärts von SO_4445 und stromaufwärts über SO_4431 hinaus, so verliert sich die Konservierung mit *Aeromonas*. Dafür findet man nun wieder für z.B. SO_4430 und SO_4446 orthologe Gene in allen sequenzierten Genomen der Familie *Shewanellaceae*, die jedoch dort direkt benachbart liegen. Damit scheint ein ursprünglich aus *Aeromonas* stammendes Gencluster tatsächlich horizontal in die Genome von *S. oneidensis* MR-1 und *S. baltica* OS223 transferiert worden zu sein. Das Gencluster kodiert in *Aeromonas* neben dem RR AHA_1023 auch eine Hybridkinase (AHA_1025) sowie vier hypothetische Proteine (AHA_1018 - AHA_1022). In *S. oneidensis* MR-1 sind davon nur noch SO_4439 (AHA_1021) und SO_4434 (AHA_1019) vollständig erhalten. Alle anderen Gene sind durch Insertionen transposasekodierender Sequenzen im ORF unterbrochen. Auch in *S. baltica* OS223 findet man eine man

eine solche Sequenz, doch bleiben hier im Gegensatz zu *S. oneidensis* MR-1 zumindest die ORFs aller transferierten Gene erhalten. Inwieweit die Expression der intakten Gene SO_4434 und SO_4439 durch SO_4444 beeinflusst wird, oder welche anderen regulatorischen Aufgaben dieser RR übernimmt, bleibt allerdings unklar.

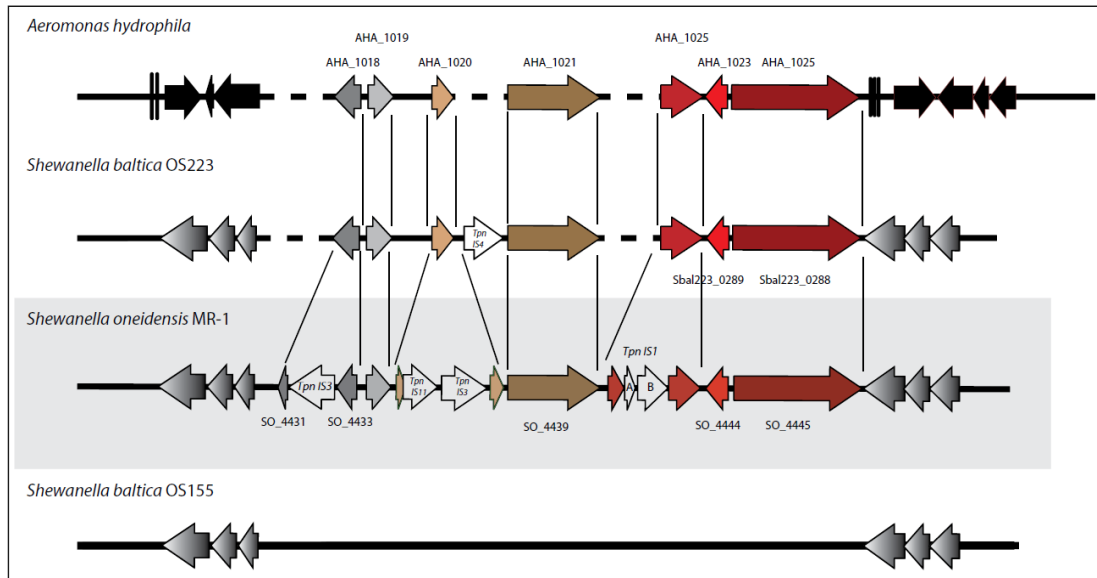


Abb. 40: **Regionenvergleich des genetischen Kontext von SO_4444** Die Abbildung zeigt den genetischen Kontext von SO_4444 im Vergleich zur orthologen Genregion in *A. hydrophila*, *S. baltica* OS223 und *S. baltica* OS155. Dabei stehen die Pfeile für einzelne Gene. Farben bzw. Schattierungen repräsentieren jeweils orthologe Gene. Der Vergleich der Genregionen lässt vermuten, dass wahrscheinlich durch horizontalen Gentransfer *S. baltica* OS223 und *S. oneidensis* MR-1 die Gene AHA_1018 - AHA_1025 erworben haben.

5.2.2 Phänotypische Analyse von *S. oneidensis* MR-1 von Δ SO_4444

Auf der Suche nach Faktoren die die Biofilmbildung von *S. oneidensis* MR-1 beeinflussen, wurde SO_4444 mehrfach unabhängig in Transposonmutagenesen identifiziert (Kai Thormann unveröffentlicht) (219). Darüber hinaus wurde die Bedeutung von SO_4444 im Biofilm während der Diplomarbeit von Lennard Marlinghaus durch Untersuchung einer *in-frame* Deletion in SO_4444 bestätigt (145). In seine Charakterisierung der Biofilmbildung von *S. oneidensis* MR-1 Deletionsmutanten bezog L. Marlinghaus dabei auch die Hybrid-HK SO_4445 mit ein. Ebenso wie Δ SO_4444 zeigte Δ SO_4445 eine gegenüber dem Wildtyp veränderte Biofilmbildung. Sowohl Lage als auch phylogenetische Herkunft beider Gene legen so den Schluss eines funktionalen TCS-Systems aus SO_4444 und SO_4445 nahe. Zur Bestätigung dieser Hypothese erzeugte ich unabhängig von L. Marlinghaus erneut Einzeldelationen in SO_4444 und SO_4445 und konstruierte zusätzlich einen Stamm Δ SO_4444/SO_4445 mit Deletionen in beiden Genen. Anschließend untersuchte ich die Stämme auf veränderte Biofilmbildung sowohl im statischen als auch im Hydrodynamischen Flusskammersystem (Abb. 41).

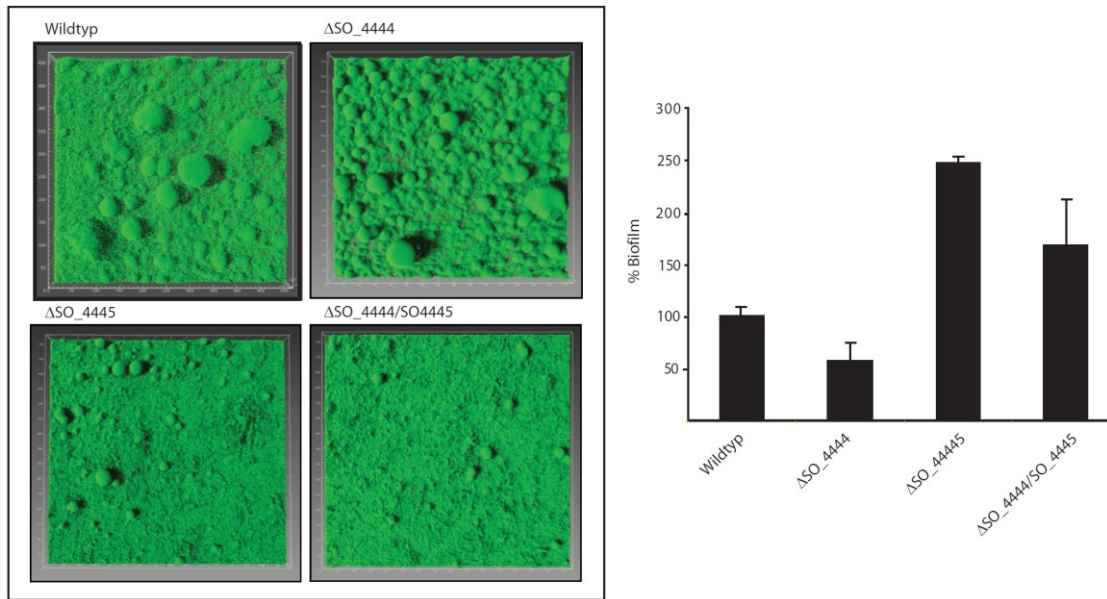


Abb. 41: Biofilmbildung von *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp ΔSO_{4444} , ΔSO_{4445} und $\Delta SO_{4444}/SO_{4445}$

Links: Die Abbildung zeigt die Biofilmbildungsstadien verschiedener GFP-fluoreszenzmarkierter *S. oneidensis* MR-1 Stämme nach 48h im hydrodynamischen Flusskammersystem. Dabei bildet ΔSO_{4444} deutlich mehr dreidimensionale Strukturen als der Wildtyp aus, ΔSO_{4445} hingegen deutlich weniger. Interessanterweise folgt der Doppeldeletionsstamm $\Delta SO_{4444}/SO_{4445}$ phänotypisch der Deletion in der HK-Mutante ΔSO_{4445} . Rechts: Gezeigt ist die quantitative Auswertung von Biofilmbildung im Mikrotiterplattenformat. Dabei ist die Biofilmbildung verglichen mit dem Wildtyp in ΔSO_{4444} , ΔSO_{4445} und $\Delta SO_{4444}/SO_{4445}$ gestört.

Sowohl ΔSO_{4444} als auch ΔSO_{4445} zeigen im hydrodynamischen Flusskammersystem und im statischen MTP-Format eine vom Wildtyp abweichende Biofilmentwicklung. Jedoch ist diese in den einzelnen Mutanten sehr unterschiedlich. So entwickelt ΔSO_{4444} im statischen Biofilm nur ca. 70% der Biomasse bezogen auf den Wildtyp und bildet im hydrodynamischen Flusskammersystem deutlich mehr dreidimensionale Strukturen aus. Im Gegensatz dazu produziert unter statischen Bedingungen ΔSO_{4445} deutlich mehr Biomasse als der Wildtyp, kann aber unter hydrodynamischen Bedingungen nahezu keine dreidimensionalen Strukturen ausbilden. Die Doppeldeletionsmutante $\Delta SO_{4444}/SO_{4445}$ folgt in ihrem Phänotyp nicht dem RR, sondern der Kinase. Damit deuten die phänotypischen Charakterisierungen der Mutanten ΔSO_{4444} , ΔSO_{4445} und $\Delta SO_{4444}/SO_{4445}$ eher auf das Wirken der zwei Komponenten in unterschiedlichen TCS-Systemen. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass beide Proteine über komplexere Signaltransduktionsschemata miteinander verknüpft sind.

5.2.3 Transkriptomanalysen an der Deletionsmutante ΔSO_{4444}

Die Veränderungen zwischen ΔSO_{4444} und Wildtyp in der Biofilmentwicklung machen den Einfluss des Regulators gerade bei der Besiedlung einer Oberfläche deutlich. Um nun herauszufinden, welche Gene durch ΔSO_{4444} reguliert werden und welche davon mögliche Kandidaten für die Beeinflussung des Biofilms sind, wurden Zellen des Wildtyps und von ΔSO_{4444} als biologische Pentaplikate 1 h auf Filterplatten gepresst und dort für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurden die RNAs isoliert, zusammengefasst und als technisches Triplikat im Array untersucht. Nur Gene mit einem P-Wert $\leq 0,05$ und einem mehr als zweifachen Unterschied in der Transkriptmenge zwischen Wildtyp und

Δ SO_4444 wurden als signifikant reguliert betrachtet (Probengewinnung und Transkriptionsanalyse Thormann & Gao unveröffentlicht).

Verglichen mit dem Wildtyp sind im Transkriptom von Δ SO_4444 14 Gene positiv und 101 Gene negativ reguliert (Abb. 42, Anhang 2). Damit scheint unter den getesteten Bedingungen SO_4444 eher Aktivator als Repressor zu sein. Da Δ SO_4444 keine RNA von SO_4444 exprimieren sollte, der Wildtyp hingegen schon, ist die beobachtete negative Regulation für dieses Gen (-4,5fach) eine gute interne Qualitätskontrolle der Transkriptionsanalyse.

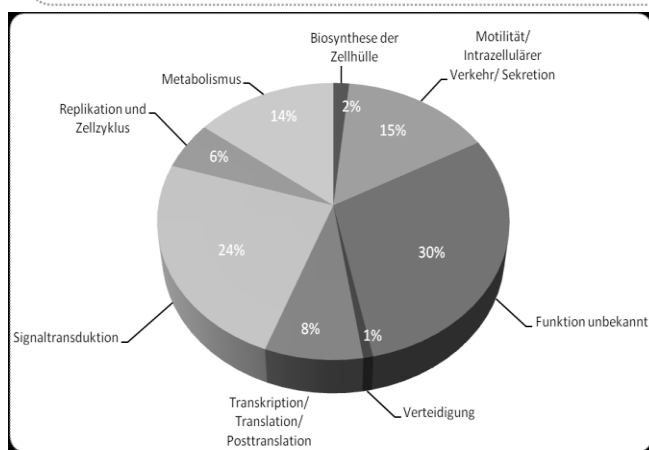
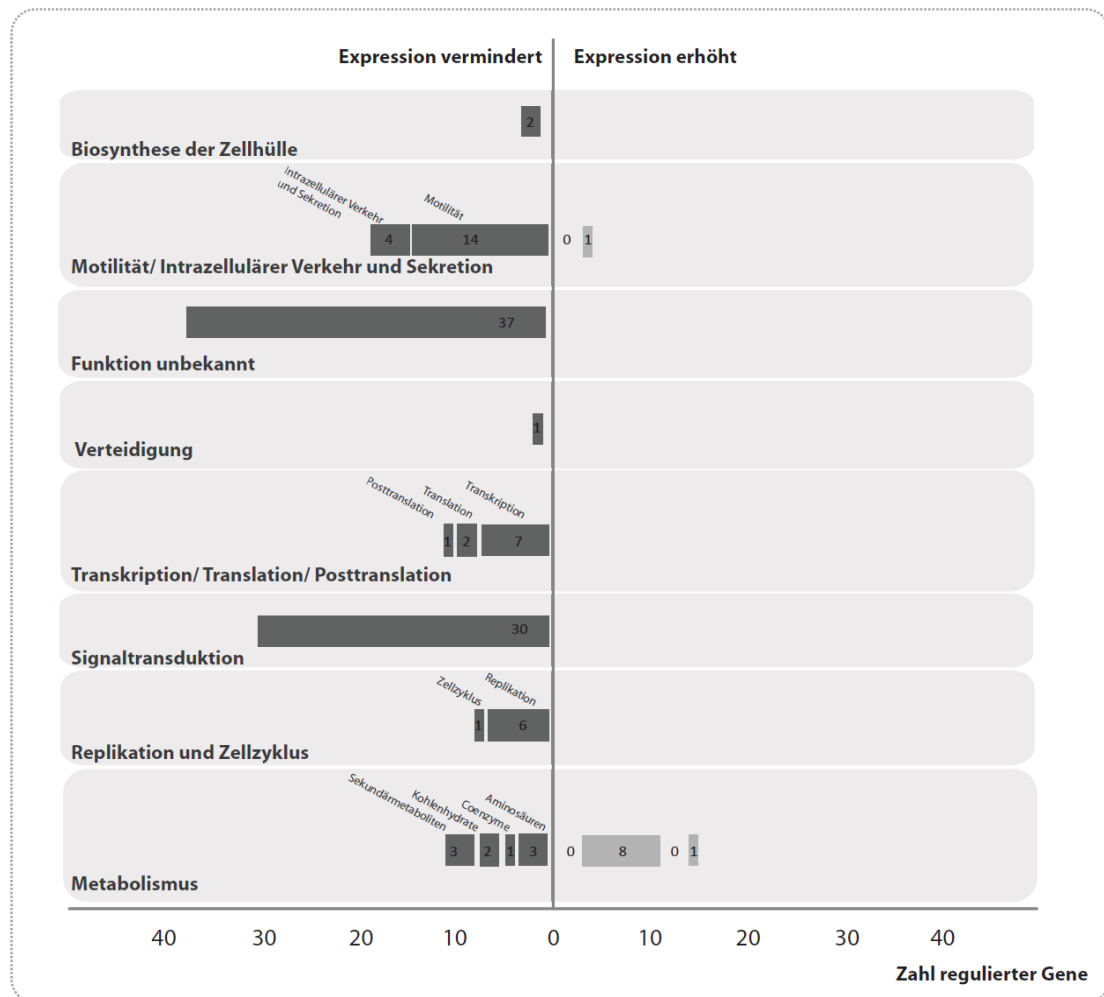


Abb.42: Das Transkriptom von Δ SO_4444

Das Transkriptom von Δ SO_4444 relativ zum Transkriptom des Wildtyps zeigt eine veränderte Expression für 115 Gene, der überwiegende Anteil davon ist negativ reguliert. Damit ist SO_4444 in seiner aktiven Form eher ein Aktivator. Oben: Dargestellt ist die Expression der durch SO_4444 beeinflussten Gene bezogen auf den Wildtyp. Dabei zeigt die linke Hälfte alle negativ regulierten Gene, die rechte Hälfte alle positiv regulierten Gene. Die für links angefertigte Beschriftung trifft in gespiegelter Form auch für die rechte Seite zu. In den einzelnen Kategorien (Graue Kästen) ist die Zahl der betroffenen Gene gesondert aufgeführt. Unten: Das Kuchendiagramm zeigt die relative Verteilung regulierter Gene nach funktionalen Kategorien in %.

Nach unserer Hypothese ist – verglichen mit anderen Regulatoren wie ArcA – SO_4444 evolutiv relativ jung. Umso beeindruckender ist es, dass SO_4444 115 Gene signifikant beeinflusst, die überwiegende Mehrzahl dieser Gene (101) positiv (Abb. 41). Damit scheint SO_4444 unter den getesteten Bedingungen in seiner Hauptfunktion ein Aktivator zu sein. Ein weiterer interessanter Punkt ist, dass sich unter den regulierten Genen nicht nur solche finden, die für spezies-spezifische Proteine kodieren. Auch Gene, die konservierte Funktionen vermitteln, sind in ihrer Expression durch SO_4444 beeinflusst. Unter diesen findet sich z.B. auch *prkA* (-4,4fach) (60) und das im gleichen Operon stromabwärts gelegene Gen SO_2883 (-3,3fach). Beide sind im gleichen genetischen Kontext sogar im grampositiven *B. subtilis* zu finden. Ein anderes Beispiel sind die Untereinheiten der periplasmatischen Nitratreduktase NapA und NapD, deren Gene *napA* (-2,4fach) und *napD* (-3,2fach) ebenso unter Kontrolle von SO_4444 stehen. Dennoch sind die in *S. oneidensis* MR-1 am stärksten regulierten Gene spezies-spezifisch. So ist z.B. ein megaplasmidkodiertes Gencluster SO_A001-SO_A0013 gegenüber dem Wildtyp in Δ SO_4444 um bis zu Faktor 23,1 (SO_A0007) negativ reguliert. Die korrespondierenden Proteine sind wahrscheinlich für die Teilung (SO_A0001 (RepA), SO_A0006 (ParA ähnlich)) und Modifikation (SO_A0002 (Restriktionsendonuklease Typ II), SO_A003 (DNA-Methyltransferase) des Megaplasmid mitverantwortlich.

Ordnet man die durch SO_4444 regulierten Gene in funktionale Kategorien für die korrespondierenden Proteine, so können 30% keine Funktion zugeordnet werden. Auch Proteine des Metabolismus bilden mit 14% eine vergleichsweise große Gruppe (Abb. 41). Eine detaillierte Betrachtung jedoch offenbart, dass $\frac{1}{3}$ davon für die Biosynthese des Thiamins verantwortlich sind und somit der primäre Stoffwechsel ebenso wie Verteidigung (1%), Biosynthese der Zellhülle (2%), Replikation und Zellzyklus (6%) oder Transkription/Translation/Posttranslation (8%) in der durch SO_4444 kontrollierten Regulation eine eher untergeordnete Rolle spielen. Weitaus größere Bedeutung kommt mit 24% regulatorischen Proteinen zu. So sind in Δ SO_4444 allein vier Proteine mit GGDEF-Domäne negativ reguliert, die ihrerseits für die Produktion von zyklischem di-GMP (c-di-GMP) verantwortlich sind. Dadurch werden wiederum Proteine beeinflusst, die biofilmrelevante Funktionen vermitteln (102, 194). So könnte also der Δ SO_4444 Biofilmphänotyp auf einen gestörten c-di-GMP-Gehalt der Zelle zurückgehen. Wenn dem so ist, könnte durch eine Erhöhung des c-di-GMP Gehaltes in Zellen von Δ SO_4444 der Biofilmphänotyp komplementiert werden. Zum Test dieser Hypothese transformierte ich Zellen von *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp und Δ SO_4444 mit pARA-VCA_0956 (221). Dabei kodiert VCA_0956 eine Diguanylatzyklase, welche bereits in einer früheren Untersuchung zur Komplementation des Biofilmphänotyps von Δ *mxdA* (vgl. 9.1.4) eingesetzt wurde (221). Ebenso wie im Falle von Δ *mxdA* war es möglich, auch Δ SO_4444 nach Induktion der Expression von VCA_0956 mit 0,2% Arabinose zu komplementieren (Abb. 42). Zwar bildete auch *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp nach Induktion der Expression von VCA_0956 deutlich mehr Biofilm, doch zeigen Thormann *et al.* (221) auch, dass Δ *mxdB* nicht durch Erhöhung des intrazellulären c-di-GMP nicht komplementiert werden kann.

Mit anderen Worten kann ein c-di-GMP unabhängiger Defekt in der Biofilmbildung wie der von Δ *mxdB* nicht durch Erhöhung der intrazellulären Konzentration des sekundären Botenstoffs ausgeglichen werden. Der Biofilmphänotyp von Δ SO_4444 ist demnach sehr wahrscheinlich c-di-GMP abhängig und

damit möglicherweise das Resultat der Negativregulation der GGDEF-Proteine SO_0841, SO_0925, SO_1830 und SO_3759.

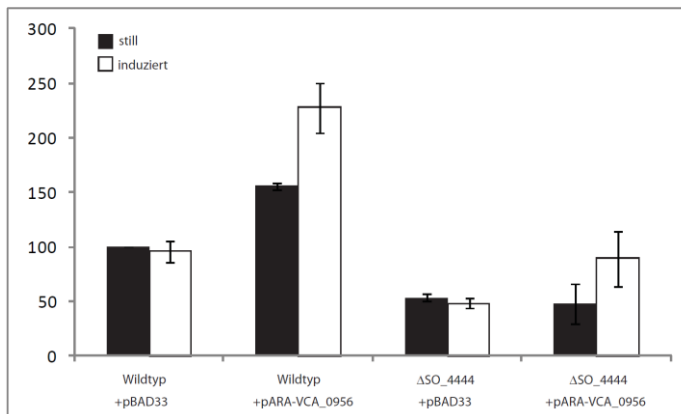


Abb.43: **Untersuchung der c-di-GMP-Abhängigkeit des Biofilms von ΔSO_4444**

Gezeigt ist die quantitative Auswertung von Biofilmbildung im MTP-Format nach Expression des für eine Diguanylatzyklase kodierenden Gen VCA_0956. Schwarze Balken repräsentieren die Biofilmbildung von Stämmen ohne Induktion der Expression von VCA_0956. Weiße Balken zeigen die Biofilmbildung von *S. oneidensis* MR-1 Stämmen nach Expression von VCA_956. Dabei kann die Erhöhung des intrazellulären c-di-GMP Gehaltes einen Wildtypbiofilm in ΔSO_4444 wiederherstellen.

Mit 15% sind Gene deren Proteine Einfluss auf die Motilität ausüben, nach Genen, die Signaltransduktionsproteine kodieren, in ΔSO_4444 gegenüber dem Wildtyp am meisten in ihrer Expression verändert. Interessanterweise handelt es sich dabei jedoch nicht um Strukturproteine der Flagelle sondern ausschließlich um Chemotaxisproteine. Frühere Studien an *S. oneidensis* MR-1 zeigten bereits einen Einfluss solcher Proteine auf die Motilität von *S. oneidensis* MR-1 auf Weichagarplatten (17), und so testete ich ΔSO_4444 auf eine Beeinträchtigung im Schwimmverhalten. Tatsächlich wies ΔSO_4444 verglichen mit dem Wildtyp nach 24 h Inkubation auf LB-Weichagarplatten einen verkleinerten Kolonieradius auf (Daten nicht gezeigt). Wie nicht anders zu erwarten, blieb ΔSO_4444 zwar motil, doch beeinflusst die veränderte Produktion der der regulierten Chemotaxisproteine deutlich das Schwimmverhalten.

6 Abschlussbemerkung

In meiner Arbeit über Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssysteme (TCS) in *S. oneidensis* MR-1 beschäftigte ich mich exemplarisch mit dem Antwortregulator (RR) SO_4444 und der Sensorkinase ArcS. Anhand dieser beiden Proteine wollte ich die Prinzipien offenlegen, denen die Evolution regulatorischer Systeme im Genus *Shewanella* unterliegt. Dabei konnte ich zeigen, wie der Antwortregulator SO_4444 als phylogenetisch junges Regulationselement aus *S. oneidensis* MR-1 in dessen bestehendes regulatorisches Netzwerk eingebaut wird, und Funktionen in komplexen Prozessen wie der Biofilmbildung übernimmt.

Im Gegensatz zu SO_4444 ist dies Arc-TCS nicht auf einige wenige Mitglieder im Genus *Shewanella* beschränkt, sondern integraler Bestandteil des regulatorischen Netzwerks aller Shewanellen und darüber hinaus einer Vielzahl anderer γ -Proteobakterien. Der interessante Aspekt ist also hier nicht die Eingliederung eines neuen horizontal erworbenen Regulators sondern die fundamentale Umstrukturierung eines konservierten Systems. Dieser Umbau betrifft im Fall von *S. oneidensis* MR-1 nicht nur das Regulon von Arc, sondern geht auch mit einem strukturellen Umbau des gesamten TCS-Systems einher. In meiner Arbeit konnte ich die Histidinkinase (HK) ArcS eindeutig dem Arc-System

von *S. oneidensis* MR-1 zuordnen. Das Besondere an ArcS ist die fehlende phylogenetische Beziehung zu anderen ArcB-Proteinen sowie die abweichende modulare Struktur (Abb. 13). Die Untersuchung der einzelnen Module von ArcS offenbarte einen Regulationsmechanismus im *S. oneidensis* MR-1 Arc-System der sich deutlich von dem in *E. coli* unterscheidet. So ist die Stilllegung der Kinaseaktivität in ArcS zumindest nicht allein durch Disulfidbrückenbildung innerhalb einer PAS-Domäne erklärbar wie im Falle von *E. coli* ArcB. Vielmehr kontrolliert hier ein Zusammenspiel von regulatorischer ArcS-RecI-Domäne und ArcS-PASII₅₉₄₋₆₉₈ die Aktivität des Proteins. Trotzdem ist es möglich Deletionen in den Arc-Systemen von *S. oneidensis* MR-1 und *E. coli* zu kreuzkomplementieren. Die funktionale Konservierung nach struktureller Diversifikation wirft die Frage auf, warum im Genus *Shewanella* ein Arc-System mit einer „neuen“ HK ArcS unter Erhalt der Komponenten ArcA, HptA evolvierte.

Auch im Falle des RR SO_4444 bleiben grundlegende Fragen offen. So konnte eine korrespondierende Sensorkinase bislang nicht zweifelsfrei identifiziert werden. Des Weiteren ist unklar welche Rolle die ebenso durch horizontalen Gentransfer erworbenen Gene im Kontext von SO_4444 spielen oder ob die Beeinflussung von Biofilm und Motilität direkter oder indirekter Natur sind. Trotzdem ist es mir gelungen, evolutionäre Prozesse in *S. oneidensis* MR-1 an Hand der TCS aufzuzeigen und nachzuvollziehen.

7 Diskussion

7.1 Antwortregulator SO_4444

7.1.1 RcsB ein mögliches Homolog zu SO_4444?

Meine Untersuchungen am RR SO_4444 liefern Hinweise auf einen horizontalen Gentransfer von *A. hydrophila* nach *S. oneidensis* MR-1. Auf der Suche nach weiteren homologen Proteinen die Aufschluss über ursprüngliche Funktionen geben können, glich ich die Sequenz von SO_4444 gegen das *E. coli*-Proteom ab. Dort ist die Sequenz des RR RcsB mit 63% SO_4444 am sequenzähnlichsten (Abb. 44). Interessanterweise wird auch im *S. oneidensis* MR-1 Genom SO_4444 als *rscB* annotiert. Möglicherweise sind also *E. coli* RcsB und SO_4444 phylogenetisch gleichen Ursprungs. Rcs wurde erstmals als transkriptionaler Regulator des Colansäure-Biosynthesecusters in *E. coli* identifiziert (74) und ist in den Enterobakterien mit der korrespondierenden Sensorkinase RcsC und der Histidin-Phosphotransferase (Hpt) RcsD hochkonserviert (3, 38, 231). Sequenzvergleiche von RcsC mit *S. oneidensis* MR-1 ergaben jeweils die größten Übereinstimmungen mit SO_4445. Jedoch betreffen diese nur den regulatorischen Bereich. Im sensorischen Bereich verfügt SO_4445 nicht über die RcsC-typische PAS-Domäne und auch ein orthologes Protein zu RcsD sucht man in *S. oneidensis* MR-1 vergeblich. Allerdings besitzt SO_4445 carboxyterminal eine Hpt-Domäne. Die Existenz einer Hpt wie RcsD wäre demnach obsolet. Darüber hinaus regulieren das *E. coli* RcsBCD-System genau wie SO_4444 und SO_4445 die natürliche Biofilmbildung im jeweiligen Organismus (59). Es stellt sich die Frage, ob

SO_4444 mit SO_4445 ein modifiziertes RcsBCD-System rekonstituiert, oder ob beide Proteine Regulatoren in bislang nicht charakterisierten voneinander unabhängigen TCS-Systemen sind.

Die ektopische Expression von entweder SO_4444 oder SO_4445 in *E. coli* $\Delta rcsB$ respektive $\Delta rcsC$ konnte weder Biofilmphänotyp noch Glutamatabhängige Säuresensitivität (34) komplementieren (Daten nicht gezeigt). Wahrscheinlich trifft also der von mir angesprochene zweite Fall zu, und SO_4444 und SO_4445 sind Komponenten in TCS-Systemen, die bislang noch nicht charakterisiert worden.

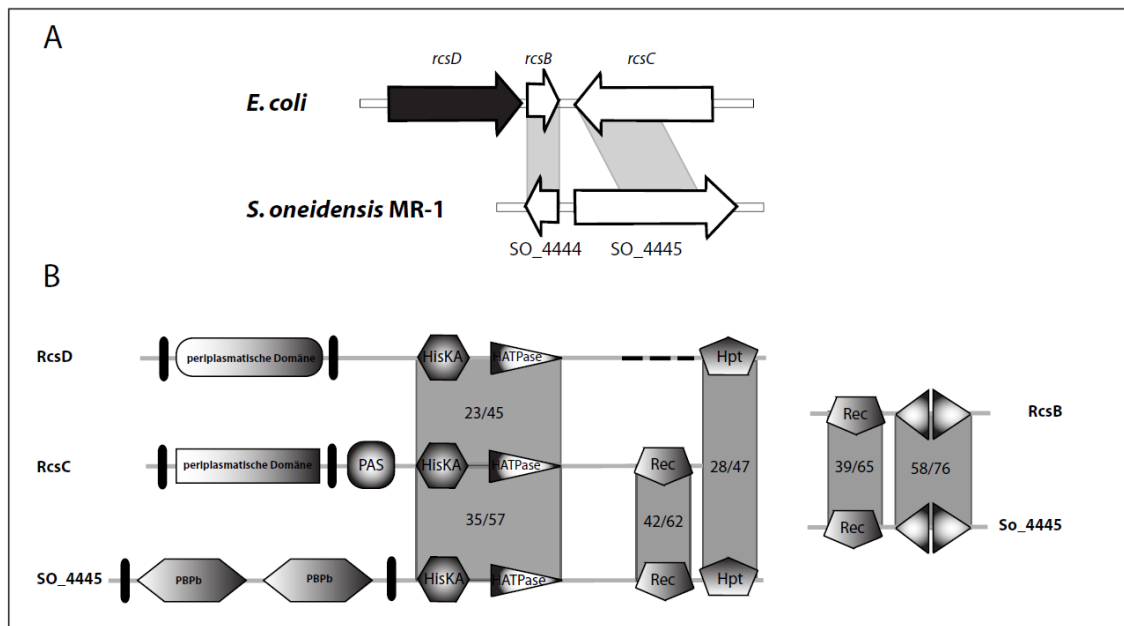


Abb. 44: Domänenorganisation von *S. oneidensis* MR-1 SO_4444, SO_4445, und *E. coli* RcsB, RcsC und RcsD

Die Abbildung zeigt A) die genetische Organisation von *S. oneidensis* MR-1 SO_4444 und SO_4445 verglichen mit *E. coli* *rcsBCD*. Dabei zeigen SO_4444 und SO_4445 eine ähnliche Lage zueinander wie *rcsB* zu *rcsC*. Jedoch laufen die ORFs von RR und HK in *S. oneidensis* MR-1 voneinander weg, in *E. coli* hingegen aufeinander zu. Ebenso fehlt in *S. oneidensis* MR-1 ein ORF für ein mögliches orthologes Gen zu *rcsD*. Die Pfeile zeigen Richtung und Länge der ORFs. Weiße Pfeile mit grauen Balken zeigen mögliche Homologien zwischen *S. oneidensis* MR-1 und *E. coli*. Der schwarze Pfeil stromaufwärts von *rcsC* deutet das Fehlen eines eindeutigen orthologen Gens in *S. oneidensis* MR-1 an. B) zeigt die Domänenorganisation von SO_4444 und SO_4445 im Vergleich zu *E. coli* RcsBCD. Dabei zeigen die RR RcsB und SO_4444 vor allem in der DNA-Bindedomäne sequenziell deutliche Übereinstimmungen (58% Identität/76% Ähnlichkeit). Die Hybrid-HK SO_4445 umfasst neben einer Rec-Domäne im regulatorischen Bereich auch eine Hpt-Domäne, die der HK RcsC fehlt. Damit könnte auch ohne eine zusätzliche Hpt RcsD in *S. oneidensis* MR-1 ein funktionales TCS-System aus SO_4444 und SO_4445 rekonstituiert werden. Darüber hinaus ergeben sich fundamentale Unterschiede zwischen RcsC oder RcsD und So_4445 im sensorischen Bereich. Graue Bereiche decken analoge Domänen ab und geben anhand der Graustufe Auskunft über die Ähnlichkeit. Die Zahlen innerhalb der grauen Bereiche stehen für Identität/Ähnlichkeit in %.

7.1.2 SO_4444 und SO_4445 Komponenten in einem TCS-System ?

Meine phänotypische Charakterisierung der Biofilme von Δ SO_4444 und Δ SO_4445 ergab für beide Deletionsstämme deutliche Unterschiede zum *S. oneidensis* MR-1 Wildtyp. Jedoch verhielten sich die Stämme untereinander gegensätzlich. So bildete Δ SO_4445 gegenüber dem Wildtyp deutlich mehr Biofilm, Δ SO_4444 hingegen deutlich weniger. Darüber hinaus beobachtete ich eine Dominanz des SO_4445 Phänotyps im Doppeldeletionsstamm Δ SO_4444/SO_4445. Wenn also beide Komponenten in einem System zusammenarbeiten so, kann diese nicht auf einem einfachen Phosphorelaisystem von SO_4445 auf SO_4444 beruhen.

Im Transkriptom von Δ SO_4444 sind 115 Gene reguliert, davon 88% negativ. SO_4444 ist also in erster Linie ein Transkriptionsaktivator. Das wiederum setzt eine Phosphorylierung von SO_4444 voraus. Ein einfaches TCS-System aus SO_4445 und SO_4444 würde bei Verlust einer der beiden Komponenten immer den gleichen Phänotyp im korrespondierenden Deletionsstamm ausprägen, entweder in Folge des Verlustes (Δ SO_4444) oder fehlender Aktivierung (Δ SO_4445) des Transkriptionsfaktors. Doch diese einheitlichen Phänotypen werden in den Stämmen Δ SO_4444 und Δ SO_4445 nicht beobachtet (Abb. 41 und 43). In einem Szenario bei dem SO_4444 und SO_4445 dennoch zusammenarbeiten, müsste es demnach mindestens einen zusätzlichen Faktor X als Phosphogruppenüberträger auf SO_4444 geben. Dennoch bleibt es selbst für diesen hypothetischen Fall schwierig, den Phänotyp der Doppeldeletion Δ SO_4444/SO_4445 zu erklären. Es ist also eher wahrscheinlich, dass beide Komponenten unabhängig voneinander die Biofilmbildung von *S. oneidensis* MR-1 regulieren. Trotzdem müssen weitere Versuche, insbesondere *in vivo* und *in vitro* Interaktionsstudien diese Theorie noch untermauern.

7.1.3 SO_4444 und Plasmidsegregation

Mehrfache unabhängige Studien (145, 219) zeigen den Einfluss von SO_4444 auf die Biofilmbildung. Als mögliche Ursache führte ich den veränderten c-di-GMP-Gehalt in Zellen des Deletionsstammes Δ SO_4444 an. So konnte z.B. eine Erhöhung der c-di-GMP-Konzentration in Δ SO_4444 den Biofilm phänotypisch komplementieren. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass unter den mehr als 100 regulierten Genen nicht weitere c-di-GMP unabhängige Biofilmeffektoren sind.

Das durch SO_4444 am stärksten regulierte Cluster umfasst die Gene SO_A0001-SO_A0013. Diese Gene liegen interessanterweise nicht auf dem Chromosom von *S. oneidensis* MR-1 sondern auf einem 160 kbp Megaplasmid. Unter diesen Genen kodiert SO_A001 ein orthologes Protein zu RepA, und SO_A006 wird der Familie der ParA-Proteine zugeordnet. Aufgrund der annotierten Funktion spielen diese Proteine möglicherweise bei der Partitionierung des Megaplasmid auf die Tochterzellen eine Rolle. Zwar liegt der wahrscheinlichere *parAB*-Locus (SO_A0095 und SO_A0096) (19) außerhalb des durch SO_4444 regulierten Clusters, doch ist es gut vorstellbar, dass SO_A0001 und SO_A0006 eine helfende Funktion bei der Plasmidsegregation und/oder -stabilisierung zukommt (19, 189). Darüber hinaus könnten auch die Proteine SO_A0002-SO_A0004 die Stabilität des *S. oneidensis* MR-1 Megaplasmid beeinflussen. Im Gegensatz zu SO_A0001 und SO_A0006 haben sie aber vermutlich nichts mit der Plasmidsegregation zu tun, sondern vielmehr mit der Plasmidstabilität. SO_A0004-SO_A0006 rekonstituieren ein TypII-Methylierungs- und Restriktionssystem. Die negative Beeinflussung der Expression der Gene (SO_A0001-SO_A0013) in Δ SO_4444 könnten demzufolge einen Verlust des Plasmids zumindest in einem Teil der Bakterienpopulation bedeuten oder die Kopienzahl pro Zelle beeinflussen.

Im Genus *Shewanella* schwankt die Zahl der Megaplasmiten zwischen null bis vier (Tabelle 5). Die plasmidkodierten Gene scheinen also nicht für Proteine von essentieller Bedeutung zu kodieren sondern vermitteln eher Funktionen für die Anpassung an das entsprechende Habitat. So kann z.B. die Deletion plasmidkodierter Gene einen Einfluss auf die Biofilmbildung von *S. oneidensis* MR-1 haben (Kai Thormann unveröffentlicht). Durch den Verlust des RR SO_4444 und die resultierende mögliche Instabilität des Plasmids könnte man so – als indirekte Folge – den beobachteten Biofilm von Δ SO_4444 erklären. Weiterführende molekulare Untersuchungen am Plasmid in Bezug auf dessen Kopienzahl können Aufschluss über die Richtigkeit meiner Hypothese geben. Anhand der vorliegenden Daten stellt sich jedoch bereits jetzt die Frage, warum die mögliche Beeinflussung der Plasmidstabilität in Δ SO_4444 nicht die negative Expression aller plasmidkodierten Gene zur Folge hat? Trotzdem, die Hypothese der durch SO_4444 beeinflussten Plasmidsegregation hat durchaus den attraktiven Aspekt, eine scheinbare Merkwürdigkeit im Verhalten der Deletion von SO_4444 zu erklären.

Wie schon erwähnt führten mehrfach unabhängige Mutationen in SO_4444 stets zu einer Veränderung der Biofilmbildung in den korrespondierenden Mutantenstämmen. Diese Veränderung ist aber interessanterweise irreversibel. Weder die ektopische Expression von SO_4444 in Δ SO_4444 noch die Wiederherstellung des Wildtypgenotyps konnten den Defekt in der Biofilmbildung komplementieren. Der Verlust des Megaplasmiten allerdings wäre eine gute Erklärung das phänotypisches Verhalten der Stämme Δ SO_4444 und KI-SO_4444 zu erklären.

7.1.4 Stammbäume und horizontaler Gentransfer

Phylogenetische Stammbäume basieren meist auf Sequenzvergleichen und werden mit Hilfe bioinformatischer Methoden berechnet. Obwohl solche sequenzbasierten Bäume Einblicke in die Evolution gewähren, haben sie doch ihre Grenzen und geben nicht die evolutionäre Geschichte einer Spezies oder eines Proteins wieder. So kann z.B. horizontaler Gentransfer Sequenzanalysen erschweren (239). Im Falle von *Shewanella* allerdings könnte gerade der horizontale Gentransfer von SO_4444 Aufschluss über die evolutionäre Geschichte von *S. oneidensis* MR-1 geben.

Der phylogenetische Baum (Abb. 45) der *Shewanellaceae*, basierend auf Sequenzanalysen der 16 S rRNA, offenbart eine deutliche phylogenetische Distanz zw. *S. baltica* OS223 und *S. oneidensis* MR-1. Diese Distanz aber steht im Widerspruch zur Präsenz der Gene SO_4444 und Sbal_0289.

Der RR SO_4444 und sein Ortholog Sbal223_0289 wurden aus *Aeromonas* horizontal in einen gemeinsamen Vorfahren beider Stämme transferiert. Da orthologe Gene zu SO_4444 in allen anderen *Shewanellaceae* fehlen, ist dieser Vorfahr vermutlich einzig Ahn der beiden Stämme *S. baltica* OS223 und *S. oneidensis* MR-1 und legt damit eine enge phylogenetische Beziehung der beiden Stämme zueinander nahe, die der Stammbaum in Abb. 45 nicht widerspiegelt.

7.2 *S. oneidensis* MR-1 Arc-System

7.2.1 ArcS, HptA und ArcA rekonstituieren ein atypisches Arc-System

In vielen γ -Proteobakterien vermittelt das Arc-TCS-System die Antwort auf den wechselnden Sauerstoffgehalt in der Umwelt. Die zugehörigen Komponenten ArcB und ArcA lassen sich dabei meist leicht über Sequenzähnlichkeiten in den Ordnungen der *Vibrionales*, der *Pasteurellales*, der *Aeromonadales*, der *Enterobacteriales* und der *Alteromonadales* identifizieren (Abb. 33). Innerhalb der Alteromonaden nimmt das *Shewanella*-Arc-TCS-System jedoch eine Sonderstellung ein. Während der RR ArcA in *E. coli* zu seinem orthologen Protein in *S. oneidensis* MR-1 zu 81% sequenzidentisch ist, lässt sich ein Ortholog zu ArcB in *Shewanella* nicht identifizieren. Dafür rekonstituiert die zu ArcB nicht orthologe HK ArcS mit der Hpt HptA und dem RR ArcA ein neuartiges Arc-TCS-System, das Fragen nach der Funktion, der Regulation und dem Signaltransduktionsmechanismus aufwirft.

7.2.2 Sensorische und mechanistische Konvergenz – ArcA, HptA und SixA

Trotz fundamentaler Unterschiede in der Domänenstruktur von ArcB und ArcS können die Deletionsmutanten $\Delta arcS$, $\Delta hptA$ und $\Delta arcS/hptA$ nach ektopischer Expression von *E. coli arcB* komplementiert werden (75, 123, 206). Genau so ist es möglich, in $\Delta arcB$ durch heterologe Expression von *arcS* und *hptA* den Wildtypphänotyp sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen wiederherzustellen (75, 206). Damit scheinen sowohl der physiologische Stimulus als auch der davon abhängige Signaltransduktionsverlauf ähnlich zu sein (Abb. 46).

Unter anaeroben Bedingungen wird die *E. coli* ArcB Kinasefunktion aktiviert und phosphoryliert ausgehend von ArcB-HK_{H292} über ArcB-Rec_{D576} und ArcB-Hpt_{H717} das katalytische ArcA_{D54} des RR ArcA (71, 142). Die Anwesenheit von Sauerstoff hingegen legt ArcB als Kinase still und ermöglicht einen reversen Phosphogruppentransfer von ArcA_{D54} über ArcB-Hpt_{H717} auf ArcB-Rec_{D576}. Über die dortige intrinsische Phosphataseaktivität wird Orthophosphat freigesetzt (68). Aus den Kreuzkomplementationsversuchen kann nun geschlussfolgert werden, dass auch *S. oneidensis* MR-1 ArcS unter anaeroben Bedingungen ein Phosphogruppe auf ArcA transferiert. Ebenso muss es bei aerobem Wachstum einen reversen Phosphogruppenfluss von ArcA auf ArcS geben.

In *in vitro* kann ArcA_{D54N} nicht mehr phosphoryliert werden. Das demonstriert die Bedeutung des konservierten ArcA_{D54} auch im *S. oneidensis* MR-1 ArcA. Darüber hinaus ist für den Phosphogruppenübertrag von ArcA auf ArcS – das dem ArcB-Hpt_{H717} homologe – HptA_{H62} essentiell. So kann *in vitro* phosphoryliertes ArcA über HptA_{H62A} die Phosphogruppe nicht an ArcS weiterleiten. Wie im *E. coli* Arc-System werden also auch bei *S. oneidensis* MR-1 die gleichen konservierten Reste für einen Phosphogruppentransfer genutzt, und ebenso wie bei *E. coli* scheint es keine direkte Interaktion zwischen der Kinasedomäne von ArcS und der Rec-Domäne von ArcA zu geben (68). Der Unterschied besteht an dieser Stelle nur in der Abkopplung der ArcB-Hpt-Domäne als eigenständiges Protein HptA in *S. oneidensis* MR-1.

Ogino *et al.* identifizierten mit der Histidin-Phosphatase SixA 1998 eine zusätzliche regulatorische Komponente im *E. coli* Arc-TCS-System (170). SixA dephosphoryliert dort spezifisch ArcB-HK_{H717}. Auch im Genus *Shewanella* ist ein orthologes Protein hochkonserviert. Mit der Konservierung der *E. coli* ArcB Hpt-Domäne in Form der *Shewanella* Hpt HptA bleibt möglicherweise auch der zugehörige Regulationsmechanismus konserviert und damit auch das volle regulatorische Potential des *E. coli* Arc-Systems erhalten. Zukünftige Studien könnten zeigen ob SixA (SO_3082) in *Shewanella* tatsächlich eine ähnliche Funktion übernimmt.

7.2.3 Mechanistische Diversität – Die zwei ArcS-Empfängerdomänen

Den deutlichen Übereinstimmungen im Carboxyterminus von ArcB und der Hpt HptA oder den orthologen Proteinen ArcA und SixA stehen die fundamentalen Unterschiede in der Domänenstruktur zwischen ArcS und ArcB gegenüber.

Im Gegensatz zum *E. coli* ArcB besitzt *S. oneidensis* MR-1 ArcS im Carboxyterminus eine zusätzliche Empfängerdomäne (Rec-Domäne). Vergleicht man die Rec-Domänen von ArcS mit der Rec-Domäne von ArcB so sind ArcS-RecII₁₁₁₅₋₁₂₂₉ und ArcB Rec zu 64%, RecI₉₇₀₋₁₀₈₈ und ArcB Rec zu 44% sequenzähnlich. Unsere Phosphogruppentransfer-Untersuchungen zeigen einen Transfer von HptA auf ArcS mit deutlicher Präferenz für ArcS-RecII_{D1162}. Dennoch dient auch ArcS-RecI_{D1017} als Phosphogruppenempfänger (Abb. 46).

Laub und seine Mitarbeiter zeigten bereits für die orthodoxe HKs eine Co-Evolution von Aminosäuren (aa) in der Kinasedomäne der HK und der Rec-Domäne des RR (125, 209). Für Hybrid-HK und den Phosphogruppentransfer auf eine interne Rec-Domäne und von dort weiter auf eine Hpt-Domäne scheint das Muster jedoch nicht übertragbar (Persönliche Korrespondenz). Die Eigenständigkeit der carboxyterminalen Hpt-Domäne von ArcB in *E. coli* als HptA in *Shewanella* und die spezifische Interaktion mit der Rec-Domäne von ArcA, sowie beiden Rec-Domänen von ArcS, sind eine hervorragende Grundlage mögliche aa-Co-Evolution auch in Phosphorelaisystemen zu untersuchen.

Vorläufige vergleichende Sequenzstudien an den Rec-Regionen von ArcS, ArcB, UvrY und BarA konnten in der Tat einige aa identifizieren, welche in ArcS, ArcB, ArcA sowie ArcS RecII konserviert sind nicht aber in ArcS RecI, BarA oder UvrY (Daten nicht gezeigt). Diese aa könnten in zukünftigen Experimenten substituiert werden und auf Veränderungen in der Spezifität beim Phosphogruppentransfer hin getestet werden. Vielleicht erlauben die daraus gewonnenen Erkenntnisse sogar generelle Aussagen über aa-Co-Evolution in komplexen Multischritt-Phosphorelaisystemen. Zum jetzigen Zeitpunkt jedoch lassen meine *in vitro* Phosphogruppentransferstudien für den reversen Phosphogruppentransfer im *S. oneidensis* MR-1 Arc-System lediglich eine unterschiedliche Präferenz der beiden Rec-Domänen ArcS-RecI und ArcS-RecII im Phosphogruppentransfer von HptA auf ArcS zu wobei ArcS-RecII Hauptempfänger und RecI Nebenempfänger ist. Diese Aufteilung lässt sich auch in meinen *in vivo* Analysen der Stämme KI-arcS-RecI_{D1017N}, KI-arcS-RecII_{D1162N} und KI-arcS-RecI+II_{D1017/1162N} unter aeroben Bedingungen nachvollziehen. So zeigt die Substitution von ArcS-

RecI_{D1017} zu Asn in KI-*arcS*-RecI_{D1017N}, verglichen mit dem Wildtyp, nur geringe phänotypische Auswirkungen auf die Expression von *csgAB* oder das Wachstum. Im Gegensatz dazu resultiert der Austausch von ArcS-RecII_{D1162} zu Asn in KI-*arcS*-RecII_{D1162N} oder KI-*arcS*-RecI+II_{D1017/1162N} immer in der Ausprägung des Δ *arcS* Phänotyps. Das wirft die Frage nach der biologischen Bedeutung von ArcS-RecI_{D1017} auf. Zur Klärung überproduzierte ich ArcS-RecI_{D1017N} in einem Δ *arcS* Hintergrund (Δ *arcS* + pBAD33-*arcS*_{D1017N}). Unter diesen Bedingungen ist es möglich einen Δ *arcS* Phänotyp für die Expression von *csgAB* hervorzurufen. Dabei können unspezifische Effekte aufgrund einer Überproduktion von ArcS ausgeschlossen werden, zeigt doch Δ *arcS* + pBAD33-*arcS* unter Zusatz von Arabinose den Wildtypphänotyp. Vielmehr liegt an dieser Stelle eine Überbetonung der Funktion von ArcS-RecI vor, die nicht im Transfer einer Phosphogruppe von ArcS auf ArcA liegt, sondern eher in der Aktivierung bzw. Deaktivierung der Kinase-Aktivität gegenüber der Phosphataseaktivität.

Die Bifunktionalität einer HK am korrespondierenden RR konnte bereits an vielen Beispielen gezeigt werden (26, 36, 90, 141). Sie erlaubt die genaue Justierung des Phosphorylierungsniveaus des RR. Im Falle von ArcS könnte also die Überrepräsentation einer der beiden Funktionen (Kinase/Phosphatase) die phänotypischen Unterschiede zwischen KI-*arcS*-RecI_{D1017N} und Δ *arcS* + pBAD33-*arcS*-RecI_{D1017N} erklären. Aus den Phosphogruppentransferstudien und den *in vivo* Analysen an KI-*arcS*-RecII_{D1162N} und KI-*arcS*-RecI+II_{D1017/1162N} ist bekannt, dass die Phosphogruppe hauptsächlich ArcS-RecII_{D1162} bedient. Darüber hinaus kann aus den Kreuzkomplementationsstudien in *E. coli* und *S. oneidensis* MR-1 Δ *arcS*-Stämmen ein reverser Phosphogruppenfluss unter aeroben Bedingungen abgeleitet werden. Nehmen wir nun an, phosphoryliertes ArcS-RecI_{D1017} stimuliert die ArcS-Kinaseaktivität. Unter aeroben Bedingungen bei nativen Konzentrationen von ArcS spielt dann eine gesteigerte Kinaseaktivität nur eine untergeordnete Rolle. Die Produktion der nicht phosphorylierbaren Version ArcS-RecI_{D1017N} zeigt unter natürlichen Bedingungen keine phänotypischen Auswirkungen (vgl. Phänotypen KI-*arcS*-RecI_{D1017N}). Bei einer Überproduktion von ArcS kann der natürliche Phosphorylierungsgrad der ArcA-Population nur durch gezielte Feinjustierung der Kinaseaktivität erhalten bleiben (vgl. Phänotypen Δ *arcS* + pBAD33-*arcS*). In Δ *arcS* + pBAD33-*arcS*-RecI_{D1017N} kann diese Justierung nicht erfolgen. Der unnatürlich hohe Proteingehalt von ArcS wirkt nun wie eine Phosphatsenke, die über ArcS-RecII_{D1162} der ArcA-Population überproportional viel Phosphat entzieht und damit letztendlich auch eine effektive Bindung von ArcA an die DNA nicht mehr ermöglicht (104).

Die Richtigkeit dieser Hypothese vorausgesetzt, sollte unter anaeroben Bedingungen die Stimulierung der Kinaseaktivität durch Phosphorylierung am ArcS-RecI_{D1017} für ein funktionales Arc-System von entscheidender Bedeutung sein. Die Phänotypen von KI-*arcS*-RecI_{D1017N} und KI-*arcS*-RecII_{D1162N} sollten sich also gleichen. Tatsächlich haben beide Stämme verglichen mit dem Wildtyp deutliche Störungen im Wachstum mit DMSO als terminalen Elektronenakzeptor. Mehr noch der Wachstumsdefekt von KI-*arcS*-RecI_{D1017N} ist sogar stärker als bei den untereinander vergleichbaren Stämmen KI-*arcS*-RecII_{D1162N} und KI-*arcS*-RecI+II_{D1017/1162N}.

Eine Mutation von ArcS-RecII_{D1162N} unterbindet in KI-*arcS*-RecII_{D1162N} und KI-*arcS*-RecI+II_{D1017/1162N} sowohl einen vorwärts gerichteten Phosphogruppentransfer als auch Phosphataseeffekte von ArcS an ArcA. Im Gegensatz dazu erlaubt die Mutation in ArcS-RecI_{D1017N} keine Stimulierung der Kinaseaktivität von ArcS, bei gleichzeitig möglichen Phosphataseeffekten an ArcS-RecII_{D1162}.

Anders ausgedrückt: Der Phosphogruppentransfer von ArcS auf ArcA läuft über ArcS-RecII_{D1162} nicht aber über ArcS-RecI_{D1017}.

7.2.4 Rolle des katalytischen ArcS-HK_{H731}

Eine Phosphorylierung am ArcS-RecI_{D1017} stimuliert unter anaeroben Bedingungen die ArcS Kinaseaktivität und sorgt so für eine Erhöhung der Konzentration von phosphoryliertem ArcA. Damit sinkt im Gegenzug die Konzentration von unphosphoryliertem ArcA. Unter aeroben Bedingungen ist ArcS-RecI_{D1017} vermutlich mehrheitlich unphosphoryliert. Damit wird der reverse Phosphogruppentransfer von ArcA auf ArcS begünstigt. Das Verhältnis von phosphoryliertem ArcA zu unphosphoryliertem ArcA verschiebt sich zugunsten der unphosphorylierten Form. Wenn die Justierung dieses Verhältnisses die Hauptaufgabe der Sensorkinase im Arc-System ist, dann sollte eine Mutation im katalytischen ArcS-HK_{H731} in den Stämmen KI-*ArcS*-HK_{H731A} und Δ *arcS* + pBAD33-HisA-*arcS*-HK_{H731A} sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen den Phänotyp der Deletionsmutante Δ *arcS* zeigen. Und tatsächlich sind KI-*ArcS*-HK_{H731A} und Δ *arcS* + pBAD33-HisA-*arcS*-HK_{H731A} genau wie Δ *arcS* nicht in der Lage, die Expression von *csaAB* zu unterdrücken oder dem Wildtyp vergleichbare Verdopplungszeiten im Wachstum zu erreichen. Doch damit nicht genug hat eine Mutation im ArcS-HK_{H731} eher stärkere phänotypische Auswirkungen als der Verlust des gesamten Proteins. Die fehlende Kinaseaktivität alleine erklärt demnach das Verhalten der Mutanten KI-*ArcS*-HK_{H731A} und Δ *arcS* + pBAD33-HisA-*arcS*-HK_{H731A} nicht. Der Schlüssel zum Verständnis der Phänotypen liegt in einer möglichen Phosphataseaktivität von ArcS.

Untersuchungen an CckA in *Caulobacter crescentus* und EnvZ in *e. coli* zeigen, dass die Substitution des katalytischen Histidins zwar zum Verlust der Kinaseaktivität führt, doch nicht notwendigerweise die Phosphataseaktivität beeinträchtigt (36, 87). Den Verlust der Kinaseaktivität konnte ich durch meine *in vitro* Studien an ArcS-HK_{H731A} bestätigen. Die verbleibende Phosphataseaktivität von ArcS in KI-*arcS*-HK_{H731A} führt so zu einer Störung des natürlichen Verhältnisses von phosphoryliertem ArcA zu unphosphoryliertem ArcA und erklärt den oben beschriebenen Phänotyp.

Jeon *et al.* postulierten 2001 ein Modell bei dem ArcA Homodimer aus ArcA und ArcA-P im Verhältnis 1:1 bildet und das nur diese Dimere DNA binden können (104). Weiterhin weiß man, dass ArcA auch unter aeroben Bedingungen Genexpression sowohl in *E. coli* und *S. oneidensis* MR-1 direkt unterdrücken kann (52, 67). Fasst man diese beiden Erkenntnisse zusammen, muss man von einer Bindung ArcAs an die DNA nicht nur unter anaeroben sondern auch unter aeroben Bedingungen ausgehen. Doch wenn dem so ist, wie werden vorhandene DNA-Bindungen in Abhängigkeit von Sauerstoffs gelöst bzw. neu geknüpft? Ein eleganter Mechanismus zur Lösung dieses Problems wäre die postulierte Oktamerisierung von ArcA als Tetramer aus Dimeren (104) in Abhängigkeit des

ArcA/ArcA-P-Verhältnisses. So könnten unter anaeroben Bedingungen durch Aktivierung von ArcB als Kinase viele ArcA-Homodimere gebildet werden, die dann auch weiter multimerisieren. In diesem Stadium werden nun bevorzugt Promotoren anaerob zu regulierender Gene gebunden. Wechseln die Wachstumsbedingungen hin zu aerob setzt der reverse Phosphogruppenfluss ein, die Konzentration phosphorylierten ArcAs sinkt und die Multimere zerfallen mehr und mehr. Dadurch verringert sich die DNA-Bindung an die anaerob regulierten Gene. Die verbleibenden Dimere aber könnten möglicherweise jetzt Promotoren anderer Gene binden. Dieser Mechanismus setzt keine unterschiedlichen Konsensussequenzen voraus. Allein der Austausch einzelner Basen innerhalb der Konsensussequenz könnte eine Affinität des Oktamers oder Dimers zur Bindestelle favorisieren. Weiterführende *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen an modifizierten DNA-Bindestellen für ArcA in *S. oneidensis* MR-1 und/oder *E. coli* könnten Aufschluss über die Richtigkeit meiner Hypothese geben.

Die Kreuzkomplementationsversuche mit ArcS in *S. oneidensis* MR-1 bzw. ArcB *E. coli* legen einen vergleichbaren Regulationsmechanismus für die Kinase/Phosphatase-Aktivität in beiden Proteinen nahe. Durch *in vitro* Interaktionsstudien zwischen ArcA und trunkierten ArcB-Versionen postulierten Georgellis *et al.* 1998 (68) die intrinsische Phosphataseaktivität der ArcB Rec-Domäne als hauptverantwortlich für die effektive Dephosphorylierung von ArcA und schlossen eine Beteiligung des katalytischen ArcB-HK_{H292} aus. Allerdings blieb in der Arbeit von Georgellis die Mutationsanalyse konservierter Reste in *E. coli* ArcB von Iuchi *et al.* (97) unbeachtet. Diese Autoren beobachteten – ähnlich wie ich im Falle von ArcS-HK_{H731A} – auch für ArcB-HK_{H292E} nach ektopischer Produktion in ArcB-defizienten *E. coli* einen Phänotyp unter aeroben Bedingungen, der nicht der korrespondierenden Deletion gleicht, sondern eher dem Phänotyp von Stämmen, denen der RR ArcA fehlt. Damit scheint dem katalytischen ArcB-HK_{H292} und der Kinasedomäne von ArcB_{*E. coli*} entgegen der These von Georgellis *et al.* (68) sehr wohl eine Bedeutung im reversen Phosphogruppenfluss von ArcA auf ArcB zukommen. So ist ArcB-HK_{H292} vielleicht nicht direkt an der Dephosphorylierung von ArcB-Rec_{D576} beteiligt, doch die ArcB-Kinasedomäne könnte als Ganzes Konformationsänderungen im ArcB-Empfängerbereich und so eine Dephosphorylierung am ArcB-Rec_{D576} begünstigen. Wenn nun der Verlust der Kinasedomäne von ArcB_{*E. coli*} eine „Phosphatase-Konformation“ im Empfängerbereich trunkierter ArcB-Versionen bedingt, ließen sich die Phosphogruppentransferstudien in der Arbeit von Georgellis *et al.* (68) erklären und mit den Studien von Iuchi *et al.* (97) in Einklang bringen. Die Vergleichbarkeit meiner Ergebnisse mit denen von Iuchi *et al.* lässt darüber hinaus vermuten, dass das von mir aufgestellte Modell für das *E. coli* Arc-System auch im Genus *Shewanella* Anwendung findet. So könnte durchaus auch ArcSs Kinasedomäne die Stabilität des Phosphates in einem oder beiden Rec-Domänen kontrollieren und so den Phosphogruppenverlust am ArcS-RecI_{D1017} oder ArcS-RecII_{D1162} begünstigen oder behindern. Wenn dem so ist, zeigte sich trotz phylogenetischer Divergenz einmal mehr die funktionale Konvergenz.

7.2.5 Rolle der sensorischen PAS-Domänen

Die Messung des Sauerstoffgehaltes der Umgebung durch ArcB erfolgt in *E. coli* nicht direkt, sondern über den Redoxstatus des Chinonpools der inneren Membran. Dabei bilden sich unter aeroben Bedingungen intermolekulare Disulfidbrücken zwischen PAS-Domänen des Homodimers aus (Abb. 46) (142). In der Folge kommt es zu einer Rotation des Dimers und einer Inaktivierung der Kinaseaktivität von ArcB (118). Auch ArcS verfügt aminoterminal der Kinasedomäne über eine PAS-Sensorik. Im Gegensatz zu *E. coli* jedoch verfügt *S. oneidensis* MR-1 über zwei statt einer PAS-Domäne. Vergleicht man die Sequenzen beider PAS-Domänen von ArcS mit der PAS-Domäne von ArcB so zeigt nur ArcS-PASI₄₆₄₋₅₇₃ mit 57% deutliche Ähnlichkeiten mit der *E. coli* ArcB-PAS-Domäne. Interessanterweise lässt sich in diesen Sequenzvergleichen auch in ArcS ein dem ArcB-PAS_{C180} homologes ArcS-PASI_{C483} identifizieren. Im Gegensatz zu *E. coli* jedoch führen weder die Substitution dieses Cysteins (97) in ein Alanin noch die vollständige Eliminierung von ArcS-PASI₄₆₄₋₅₇₃ in den entsprechenden Stämmen zu einem vom Wildtyp unterscheidbaren Phänotyp in der Expression von *csgAB*. Im Gegensatz dazu zeigt KI-*arcS*-PASII₅₉₄₋₆₉₈ einen mit KI-*arcS*-HK_{H731A} vergleichbaren Phänotyp. Zwischen ArcB und ArcS scheinen also trotz einer Regulation in Abhängigkeit zu Sauerstoff fundamentale Unterschiede in der Wahrnehmung desselben zu bestehen. Zwar kann man annehmen, dass ebenso wie in *E. coli* auch in *S. oneidensis* MR-1 bei der Wahrnehmung der Umgebung die PAS-Sensorik eine entscheidende Rolle spielt, welcher Art diese Rolle allerdings ist, kann anhand der bis zum jetzigen Zeitpunkt durchgeführten Experimente nicht genau bestimmt werden. So bleibt zum Beispiel unklar, ob wie im Falle von ArcB der Redoxstatus des Chinonpools der Membran gemessen wird oder möglicherweise doch Sauerstoff als direkter Stimulus dient. Auch bleibt die Frage offen, wie sich sowohl KI-*arcS*-PASI₄₆₄₋₅₇₃ als auch KI-*arcS*-PASII₅₉₄₋₆₉₈ phänotypisch während aeroben und anaeroben Wachstums verhalten oder ob der in KI-*arcS*-PASII₅₉₄₋₆₉₈ beobachtete Effekt auf die Expression von *csgAB* nicht primär durch den Verlust von ArcS-PASII₅₉₄₋₆₉₈ zu erklären ist sondern vielmehr auf einer Verschiebung der Kinasedomäne in räumliche Nähe zu ArcS-PASI₄₆₄₋₅₇₃ beruht. Lässt sich die Frage nach den Wachstumsphänotypen von KI-*arcS*-PASI₄₆₄₋₅₇₃ und KI-*arcS*-PASII₅₉₄₋₆₉₈ durch Aufnahme einer Kinetik unter den entsprechenden Bedingungen in naher Zukunft noch relativ leicht beantworten, so erfordert die Beantwortung der Frage nach der Bedeutung und Rolle von ArcS-PASII₅₉₄₋₆₉₈ schon deutlich mehr Aufwand.

Sequenzanalysen an ArcS-PASII₅₉₄₋₆₉₈ identifizieren an Position 608 ein im Genus *Shewanella* hochkonserviertes Cystein. Dieses Cystein könnte möglicherweise die Rolle des ArcB-PAS_{C180} in *E. coli* übernommen haben. Die Substitution von ArcS-PASII_{C608} in Alanin und die phänotypische Analyse von KI-*arcS*-PASII_{C608A} erlaubten im Folgenden die Überprüfung der Richtigkeit meiner Hypothese.

Die Rolle der PAS-Domäne und insbesondere deren Bedeutung bei der Wahrnehmung und Weiterleitung des Signals werden kontrovers diskutiert. Zwar konnten Malpica und Kwon *et al.* (118, 142) eindrucksvoll zeigen, wie die Disulfidbrückenbildung zwischen jeweils zwei Cysteinen ArcB-PAS_{C180} und ArcB-PAS_{C241} zu einer Rotation zweier ArcB Monomere zueinander führt und so die Kinaseaktivität des Proteins unterdrückt, doch bleibt es ein Rätsel, wie ein orthologes ArcB aus *H. influenzae* ohne sensorische PAS-Domäne nach ektopischer Produktion in *E. coli* Δ *arcB* den Wildtypphänotyp unter verschiedenen Redoxbedingungen wiederherstellen kann (69). Malpica *et al.*

spekulierten 2006 (143), dass das Vorhandensein der PAS-Domäne in ArcB_{*E. coli*} eine bessere Anpassung an schnell schwankende Umweltbedingungen ermöglicht. Die nahezu konstanten Umweltbedingungen im Habitat des ausschließlich parasitär lebenden *H. influenzae* hingegen benötigen keinen PAS-abhängigen Mechanismus der Kinaseinaktivierung. Diese Hypothese zugrundegelegt finden wir im Genus *Shewanella* vielleicht den gegenteiligen Fall. So gewährleistet eine PAS-Domäne wie bei *E. coli* ArcB möglicherweise keine optimale Anpassung an die redox-stratifizierte Umwelt in der *Shewanella* Spezies leben und wurde durch eine erweiterte PAS-Sensorik in ArcS ersetzt.

7.2.6 Rolle der sensorischen CaChe-Domäne

Die verglichen mit ArcB_{*E. coli*} zusätzliche PAS-Domäne ist nicht die einzige sensorische Besonderheit von ArcS. So besitzt ArcS zusätzlich einen großen periplasmatischen Bereich, der in ArcB_{*E. coli*} fehlt. Dieser Bereich bildet entweder als Ganzes oder zumindest in Teilen eine Domäne mit putativer sensorischer Funktion (248). Zentrales Element dieser Domäne bildet der CaChe-Bereich (5). Dieser wurde im Jahre 2000 von Anantharaman *et al.* als Element calciumbindender und chemotaktischer Proteine bioinformatisch identifiziert. Jüngere Studien von Zhang *et al.* (248) demonstrieren eine Beteiligung dieser Domäne an der Bindung kleiner Moleküle. Als konserviertes putatives Bindemotiv identifizierten Zhang *et al.* RXYF (248). Dieses konservierte Motiv findet sich auch im CaChe-Bereich von ArcS und stützt zusätzlich die Idee, dass der periplasmatische Bereich von ArcS eine sensorische Funktion besitzt.

Zur Untersuchung der periplasmatischen Domäne auf die Funktionalität von ArcS deletierte ich den als CaChe annotierten Bereich und analysierte nach ektopischer Überproduktion die transkriptionale Aktivität von *csgAB* im Lux-Reporterassay (Daten nicht gezeigt). Jedoch erwies sich die um CaChe-trunkierte ArcS-Version ArcS-CaChe₂₁₄₋₂₈₉ als instabil, so dass keine wirklich vergleichende Aussage zu den Phänotypen von $\Delta arcS$ + pBAD33-HisA-*arcS* getroffen werden kann. Dessen ungeachtet scheinen allerdings geringe nicht detektierbare Mengen ArcS produziert worden zu sein. Anders jedenfalls ließe sich die phänotypische Komplementation $\Delta arcS$ nach Überproduktion von ArcS-CaChe₂₁₄₋₂₈₉ nicht erklären.

Insgesamt gesehen jedoch geben meine Versuche zum jetzigen Zeitpunkt keinen Aufschluss über die physiologische Bedeutung von ArcS-CaChe₂₁₄₋₂₈₉.

Substitutionen im RXYF Motiv die vielleicht keinen so entscheidenden Einfluss auf die Stabilität von ArcS haben, könnten in zukünftigen phänotypischen Analysen entsprechender Mutanten zur Entschlüsselung der physiologischen Bedeutung des periplasmatischen Bereichs von ArcS beitragen und darüber hinaus zum Verständnis von CaChe-Domänen allgemein.

7.2.7 Physiologischer Stimulus für ArcS

Die Besonderheiten im sensorischen Bereich von ArcS werfen die Frage auf ob die Messung des Sauerstoffgehaltes der Umwelt das einzige durch ArcS weitergeleitete Signal ist.

Gao *et al.* analysierten 2008 (67) das Transkriptom von *S. oneidensis* MR-1 $\Delta arcA$. Dabei stellte sich heraus, dass von 1009 Genen mehr als 200 unabhängig vom Sauerstoffgehalt der Umgebung durch ArcA reguliert werden, darunter auch *csgAB*. *csgAB* steht unter direkter Kontrolle von ArcA (67) und wird in seiner Expression unter aeroben Bedingungen in LB nahezu vollständig unterdrückt. Damit bietet die Messung der Promotoraktivität von *PcsgAB* die ideale Plattform zur Aufklärung möglicher zusätzlicher Stimuli für das *Shewanella* Arc-System.

In einem ersten Ansatz untersuchte ich die Promotoraktivität von *PcsgAB* in *S. oneidensis* MR-1 Wildtypzellen nach Kultivierung in Vollmedium (LB) und Minimalmedium (4M). Unabhängig vom Sauerstoffgehalt wurde die Expression von *csgAB* durch die Anzucht in Minimalmedium gegenüber in Vollmedium wachsenden Zellen um Faktor 20 gesteigert (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu haben unterschiedliche Kultivierungsbedingungen auf die Expression von *csgAB* in $\Delta arcS$ und $\Delta arcA$ keinen Einfluss. Die im Wildtyp beobachtete Steigerung der Aktivität von *PcsgAB* geht somit eindeutig auf die Aufhebung der Repression durch ArcS/ArcA zurück und nicht auf die Aktivierung durch einen Transkriptionsfaktor X. Weiterführende Untersuchungen nach dem genauen Stimulus bezogen pH-Wert (5-10), Phosphatgehalt (0-10 mM), Kohlenstoffquelle (Komplex, Lactat, N-Acetyl-Glukosamin) und den Calciumgehalt (0-250 mM) mit ein. Unter den getesteten möglichen Stimuli zeigte die Expression von *csgAB* eine lineare Abhängigkeit von der Calciumkonzentration (Daten nicht gezeigt). So konnte die Chemolumineszenz des *S. oneidensis* MR-1 Reporter-Wildtyps von 1.000 relativen Lichteinheiten (rlu) bei Calciumkonzentrationen von 0 mM auf über 1.000.000 rlu bei Calciumkonzentrationen von 250 mM gesteigert werden. Jedoch konnten ähnliche Steigerungen in der Expression auch in $\Delta arcS$ und $\Delta arcA$ gezeigt werden. Der beobachtete calciumabhängige Effekt geht als nicht auf das Arc-System sondern vielmehr auf einen Transkriptionsfaktor X zurück. Da darüber hinaus weder pH-Wert noch Phosphatgehalt oder Kohlenstoffquelle eine signifikante Beeinflussung der Expression in Abhängigkeit vom Arc-System zeigen, konnte an dieser Stelle kein eindeutiger zusätzlicher physiologischer Stimulus für das *S. oneidensis* MR-1 Arc-System identifiziert werden. Dennoch demonstrieren meine Reporterstudien deutlich, dass es diesen Stimulus geben muss. In weiterführenden Experimenten könnte die Promotoraktivität von *PcsgAB* z.B. in Abhängigkeit von der Stickstoffquelle und dem Eisengehalt getestet werden. Diese Studien könnten zusätzlich durch eine weitere Lux-Promotorfusion untermauert werden. Zum einen wäre so gewährleistet, dass mögliche Effekte die sich aus dem Detektionslimit für Chemolumineszenz ergeben, eliminiert werden. Zum anderen würde eine zusätzliche Kontrolle geschaffen, die das System und die gewonnenen Daten validiert.

Die Expression von SO_3099 wird im Gegensatz zu *csgAB* durch ArcA stimuliert. Damit wäre eine transkriptionale Promotorfusionen PSO_3099-Lux ein idealer zusätzlicher Reporter, um den bisher noch unbekannten physiologischen Stimulus im Arc-System von *S. oneidensis* MR-1 zu identifizieren. (Abb. 46)

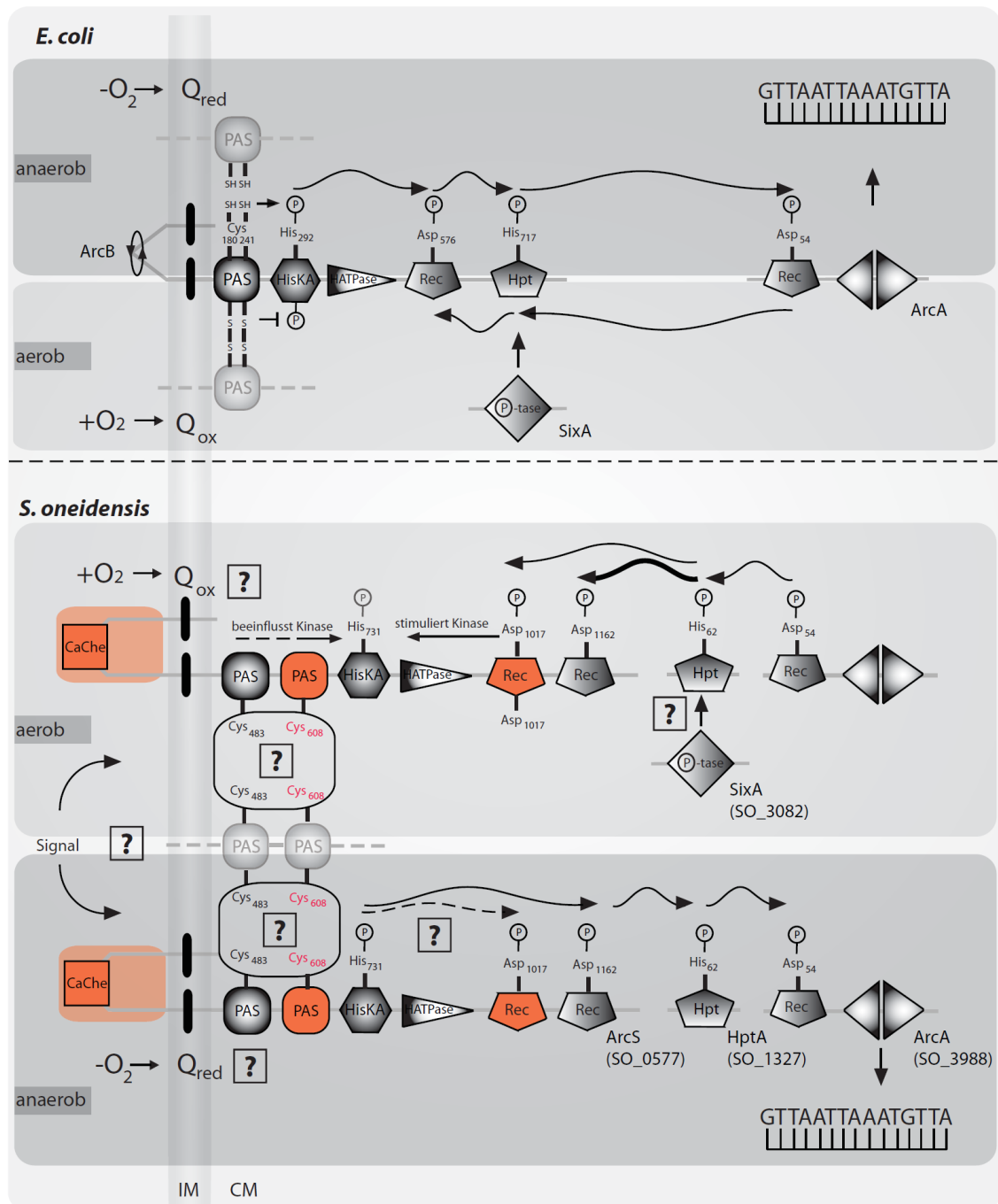


Abb. 46: *S. oneidensis* MR-1 und *E. coli* Zwei Arc-TCS-Systeme im Vergleich

Die Abbildung zeigt schematisch dargestellt das *E. coli* Arc-TCS-System (oben) und vergleicht es mit dem Arc-TCS-System in *S. oneidensis* MR-1 (unten). Oben: Unter anaeroben Bedingungen wird die Phosphogruppe erst intern von ArcB-HK_{H292} (Kinasedomäne) über ArcB-Rec_{D576} (Rec-Domäne) an ArcB-Hpt_{H717} (Hpt-Domäne) weitergeleitet, bevor am Ende der RR ArcA phosphoryliert wird (71, 117). Die Verschiebung des Verhältnisses ArcA-P/ArcA zugunsten der phosphorylierten Form bewirkt dann mehrheitlich eine Repression regulierter Gene durch Bindung an die DNA-Konsensussequenz und Unterdrückung der Transkription (143). Der Wechsel von einer anaeroben in eine aerobe Umgebung führt zu einer Oxidation des Chinon-Reservoirs in der Membran. Das ermöglicht einen Elektronentransfer von reduziertem ArcB-PAS_{C180} auf oxidiertes Chinon und führt zur Ausprägung einer intermolekularen Disulfidbrücke zwischen zwei ArcB-Monomeren. Diese Disulfidbrücke ihrerseits bedingt eine Rotation der beiden ArcB-Monomere zueinander und reduziert die Kinaseaktivität von ArcB um 85%. Bleibt das Chinonreservoir weiterhin oxidiert, bedingt durch einen schnellen Elektronenfluss auf Sauerstoff, wird die Bildung einer zweiten Disulfidbrücke am ArcB-PAS_{C241} induziert, die die Kinase vollständig deaktiviert. Diese Deaktivierung erlaubt die Reversion des Phosphogruppenflusses von ArcA_{D54} im RR ArcA über ArcB-Hpt_{H717} auf ArcB-Rec_{D576} (68, 118). Die intrinsische Phosphataseaktivität von ArcB-Rec_{D576} (71, 94) sowie eine Dephosphorylierung von ArcB-Hpt_{H717} durch die Histidin-Phosphatase SixA (170) sorgen dabei für die Feinjustierung der Phosphorylierungslevel entsprechend dem Sauerstoffgehalt.

Unten: In *S. oneidensis* MR-1 rekonstituiert sich ein funktionales Arc-TCS-System aus den Komponenten ArcS, HptA und ArcA. Dabei ist die Hpt HptA vermutlich dem Carboxyterminus des *E. coli* ArcB ortholog. Das konservierte HptA_{H62} entspricht so ArcB-Hpt_{H717}. Unter anaeroben Bedingungen wird ArcS erst intern von ArcS-HK_{H731} auf ArcS-Recl_{D1162} weitergeleitet. Ob auch ein Phosphogruppentransfer von ArcS-HK_{H731} auf ArcS-Recl_{D1017} erfolgt, ist zum jetzigen Zeitpunkt unklar. Von ArcS-Recl_{D1162} über HptA_{H62} wird ArcA_{D54} phosphoryliert und erlaubt eine Bindung an die ArcA-DNA-Konsensussequenz. Unter aeroben Bedingungen erfolgt eine Reversion des Phosphogruppentransfers von ArcA_{D54} über HptA_{H62} auf ArcS-Recl_{D1162} (Hauptempfänger) und ArcS-Recl_{D1017} (Nebenempfänger). Die Phosphorylierung von ArcS-Recl_{D1017} stimuliert wiederum die Kinaseaktivität am ArcS-HK_{H731} und reguliert die Aktivität von ArcS. Darüber hinaus ist die ArcS Aktivität von ArcS-PASII₅₉₄₋₆₉₈ abhängig. Die Bedeutung von ArcS-PASI₄₆₄₋₅₇₃ ebenso wie die Rolle von ArcS-PASIC₄₈₃ und ArcS-PASII_{C608} bleiben unklar. Auch kann zum jetzigen Zeitpunkt keine Aussage über eine Abhängigkeit ArcSs vom Redox-Zustand des Chinonpools der Membran gemacht werden. Darüber hinaus ist nicht bekannt welche zusätzlichen Reize über das *S. oneidensis* MR-1 Arc-TCS-System wahrgenommen werden, oder welche Rolle dem periplasmatischen Bereich zukommt.

Rec: Empfängerdomäne; Hpt: Histidin-Phosphotransferase-Domäne. HisKA: Histidinkinase-Domäne; HATPase: ATPase-Domäne; P-tase: Phosphatase-Domäne. CaChe: CaChe-Domäne. Die DNA-Bindedomäne von ArcA ist durch zwei aneinanderstoßende Dreiecke symbolisiert. Die gebleichten PAS-Domänen deuten jeweils den Zustand der HK als Dimer an. Q_{red}: Chinol; Q_{ox}: Chinon; Die grau unterlegte Symbolik repräsentiert regulatorische und sensorische Bereiche/Reste die sowohl im Arc-System von *E. coli* als auch von *S. oneidensis* MR-1 identifiziert werden können. Rot gekennzeichnet sind regulatorische und sensorische Bereiche/Reste die nur im *S. oneidensis* MR-1 Arc-TCS-System gefunden werden. Geschwungene Pfeile zeigen den Phosphogruppentransfer zu den entsprechend gekennzeichneten Resten. Die Pfeilstärke ist dabei ein Maß für die Bevorzugung bestimmter Reste. Gerade Pfeile symbolisieren regulatorische Einflüsse auf die Aktivität der HK.

7.2.8 Phylogenetischer Ursprung von ArcS

Meine Untersuchungen im Arc-System von *S. oneidensis* MR-1 identifizieren ArcS als phylogenetisch junges Element in einem ansonsten konservierten System. Doch was ist der evolutionäre Ursprung von ArcS?

Eine Möglichkeit wäre die Verdopplung eines bestehenden HK-Gens. Wenn dem so ist, müsste sich über Sequenzähnlichkeiten und Übereinstimmungen in der Domänenstruktur eine putative Ursprungkinase X im *S. oneidensis* MR-1 Genom identifizieren lassen.

Tatsächlich erhält man bei einem Sequenzabgleich der Kinase-Domäne von ArcS gegen das *S. oneidensis* MR-1 Proteom mit 76% deutliche Ähnlichkeiten zur Hybrid-HK SO_0859. Darüber hinaus gibt es auch in Bezug auf die Gesamtorganisation der Domänen deutliche Übereinstimmungen zwischen ArcS und SO_859. So besitzt SO_0859 ebenso wie ArcS zwei PAS-Domänen im sensorischen Bereich und zwei Rec-Domänen im regulatorischen Bereich. Jedoch liegt eine zusätzliche Hpt-Domäne carboxyterminal der Rec-Domänen von SO_0859, die in der HK ArcS fehlt. Und auch im periplasmatischen Bereich gibt es keine Übereinstimmungen zwischen SO_0859 und ArcS.

Wenn also ArcS das Produkt einer Genduplikation von SO_0859 ist, dann sind maximal die beiden PAS-Domänen, die Kinase-Domäne und die beiden Rec-Domänen von ArcS Duplikate der entsprechenden Bereiche von SO_0859. Allerdings bestehen auch hier Zweifel. Die deutlichen Sequenzunterschiede zw. SO_0859 und ArcS v.a. in den PAS-Domänen legen für diese einen anderen evolutionären Ursprung als SO_0859 nahe. So ähnelt z.B. die Sequenz von ArcS-PASI₄₆₄₋₅₇₃ mit 57% deutlich mehr der *E. coli* ArcB-PAS-Domäne (Abb. 13) als irgendeiner anderen PAS-Domäne im *S. oneidensis* MR-1 Proteom. Möglicherweise haben wir es an dieser Stelle also wieder – wie im Falle der Hpt HptA – mit einem ein phylogenetischen Relikt der „verlorenen“ Kinase ArcB zu tun.

Eine weitere Möglichkeit des phylogenetischen Ursprungs von ArcS könnte horizontaler Gentransfer sein. Vergleichende Sequenzanalysen konnten jedoch in den Genomdatenbanken keine

überzeugenden Kandidaten hierfür identifizieren. Das schließt den horizontalen Gentransfer von ArcS aus Spezies X zwar nicht vollkommen aus, macht ihn aber eher unwahrscheinlich.

Ich spekuliere daher, dass der Existenz von ArcS eine Kombination mehrerer rekombinatorischer Ereignisse zugrunde liegt. So könnten ArcS-PASII₅₉₄₋₆₉₈, die Kinasedomäne und der Empfängerbereich Ergebnis einer partiellen Genduplikation von SO_0859 sein. ArcS-PASI₄₆₄₋₅₇₃ hingegen resultierte aus der Translokation der PAS-Sequenz eines ursprünglichen ArcBs. Das so entstandene ArcS wurde zusätzlich um einen periplasmatischen Bereich unbekannten Ursprungs ergänzt und rekonstituiert in seiner heutigen Form zusammen mit HptA und ArcA das funktionale Arc-System aller Shewanellen.

8 Material und Methoden

8.1 Material

8.1.1 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 6 gelistet. Darüber hinaus verwendete Geräte sowie etwaige Abweichungen sind im Text gesondert aufgeführt.

Tabelle 6: Geräte

Gerät	Typ	Firma
Q-RT-PCR-Maschine	ABI 7300	Amersham Biosciences (Freiburg)
Mikrotiterplattenlesegerät	Infinite M200	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Immunoblot Visualisierer	LAS-4000	FujiFilm (Düsseldorf)
Konfokales Rasterfluoreszenzmikroskop	Leica TCS SP2	Leica Microsystems (Wetzlar)
PhosphorImager	Typhoon Trio PhosphorImager	Amersham Biosciences (Freiburg)

8.1.2 Chemikalien

In dieser Arbeit wurden Chemikalien von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Biotline (Luckenwalde), Sigma-Aldrich (Steinheim) und Difco (Heidelberg) verwendet. Andere Bezugspartner werden im Text gesondert aufgeführt.

8.1.3 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs (Frankfurt a.M.) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot) hergestellt. Bei der Polymerasekettenreaktion kamen die Phusion von Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf) und die Taq-DNA-Polymerase von Fermentas (St. Leon-Rot) zum Einsatz. Darüber hinaus fanden für Dephosphorylierungsreaktionen an Nukleinsäuren die Antarktische Phosphatase von New England Biolabs (Frankfurt a.M.), für Ligationen von DNA-Fragmenten die T4-Ligase von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) für die reverse Transkription zur Gewinnung von cDNA die M-MuLV Reverse Transkriptase von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und zur Gewinnung von Acetylphosphat die Acetatkinase von Sigma-Aldrich (Steinheim) Verwendung.

8.1.4 Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten „Kits“ sind in Tabelle 7 gelistet.

Tabelle 7: Kits

Bezeichnung und Firma	Verwendungszweck
DNA Clean & Concentrator (Zymo Research, Freiburg)	DNA-Aufreinigung
Zymo Clean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Freiburg)	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, Freiburg)	Isolierung von Plasmid-DNA
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer, Erlangen)	Chemiluniszendes Reagenz für HRP-abhängige Immunodetektion
CDP-Star® Reagent (New England Biolabs, Frankfurt am Main)	Chemiluniszendes Reagenz für AP-abhängige Immunodetektion

8.1.5 Antibiotika

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika und Medienzusätze sind in Tabelle 8 gelistet.

Tabelle 8: Antibiotika

Zusatz	Stammkonz.	Endkonz. entsprechend des Bakteriums	Lösungsmittel
Antibiotika			
Ampicillin-Natriumsalz	100 mg/ml	100 µg/ml	A. dest
Chloramphenicol	30 mg/ml	10 µg/ml	Ethanol 96% (v/v)
Kanamycinsulfat	25 mg/ml	50 µg/ml	A. dest
Tetracyclinhydrochlorid	10 mg/ml	2,5 µg/ml	Ethanol 96% (v/v)
Gentamycinsulfat	10 mg/ml	10 µg/ml	A. dest
Induktoren und sonstige Zusätze			
Anhydrotetracyclin	1 mg/ml	200 ng/ml	Isoamylalkohol
IPTG	1 M	1 mM	A. dest
L-Arabinose	20% (w/v)	0,2% (w/v)	A. dest
2,6-Diaminopimelinsäure (DAP)	60 mM	300 µM	A. dest
Saccharose	80% (w/v)	10% (w/v)	A. dest

8.1.6 Puffer

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer sind in Tabelle 9 gelistet. Darüber hinaus verwendete Pufferlösungen sowie etwaige Abweichungen sind im Text gesondert aufgeführt.

Tabelle 9: Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Quelle
Arbeit mit Nukleinsäuren		
<u>T</u> ris- <u>A</u> cetate- <u>E</u> DTA-Puffer (TAE)	Tris Essigsäure EDTA pH-Wert	40 mM 20 mM 1 mM 8,3 (200)
6x DNA-Ladepuffer	Tris Bromophenolblau, Xylencyanol, Glycerol, EDTA	10 mM 0.03% 0.03% 60% 60 mM
<u>T</u> ransformations <u>p</u> uffer (TB)	Kaliumchlorid Manganchlorid Calciumchlorid Pipes pH-Wert	250 mM 55 mM 15 mM 10 mM 6,7 (91)
<u>S</u> alt- <u>E</u> DTA- <u>T</u> ris-Puffer (SET)	Natriumchlorid EDTA Tris pH-Wert	75 mM 25 mM 20 mM 7,5 (184)
Arbeit mit Proteinen		
5x Protein-Ladepuffer	SDS Bromophenolblau Glycerol DTT Tris pH-Wert	10% (w/v) 0,05% (w/v) 50% (w/v) 0,5 M 0.313 M 6.8 (120)
10x <u>T</u> ris- <u>G</u> lycin- <u>S</u> DS-Puffer	Tris Glycin SDS	0,1 M 0,8 M 0,25% (w/v) (120)
Trenngelpuffer	Tris SDS pH-Wert	1,5 M 0,4% (w/v) 8,8 (120)
Sammelgelpuffer	Tris SDS pH-Wert	0,5 M 0,4% (w/v) 6,8 (120)
Protein-Lysepuffer	Tris Natriumchlorid PMSF DTT pH-Wert	50 mM 150 mM 0,2 mM 1mM 7,2

8.1.7 Medien

Die in dieser Arbeit verwendeten Medien sind in Tabelle 10 gelistet.

Tabelle 10: Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Quelle
<u>L</u> ysogeny <u>B</u> roth (LB) (Luria/Miller)	Trypton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l Natriumchlorid 10 g/l pH-Wert 7,0 Lactat (anaerobe Kultivierung) 20 mM Fumarat (anaerobe Kultivierung) oder 40 mM DMSO (anaerobe Kultivierung) 200 mM	(18)
<u>S</u> uper <u>O</u> ptimal <u>B</u> roth (SOB)	Trypton 20 g/l Hefeextrakt 5 g/l Magnesiumchlorid Natriumchlorid 0,95 g/l Kaliumchlorid 0,5 g/l pH-Wert 0,186 g/l 7,0	(79)
<u>S</u> uper <u>O</u> ptimal <u>B</u> roth with <u>C</u> atabolite Repression (SOC)	SOB Glukose 20 mM	(79)
<u>L</u> actate <u>M</u> edium (LM)	Hefeextrakt 0,2 g/l Pepton 0,1 g/l HEPES 10 mM Natriumchlorid 100 mM Milchsäure 15 mM pH-Wert 7,5	(174)
<u>M</u> yers and <u>M</u> yers <u>M</u> inimal <u>M</u> edium (4M)	Natriumchlorid 150 mM Natriumphosphat 5 mM Ammoniumsulfat 10 mM Magnesiumsulfat 0,5 mM Calciumchlorid 50 mM Mangansulfat 0,13 mM Eisen (II) Clorid 0,54 mM Cobaltchlorid 0,5 mM Zinksulfat 0,1 mM Kupfersulfat 0,02 mM Borsäure 5,66 mM Natriummolybdat 0,39 mM Nickelchlorid 0,5 mM Natriumselenat 0,15 mM HEPES 25 mM Milchsäure <u>oder</u> 40 mM N-Acetylglucosamin 40 mM pH-Wert 7,5	(72)

8.1.8 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide („Primer“) wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) synthetisiert. Eine vollständige Liste über die verwendeten Oligonukleotide findet sich in Tabelle 11.

Tabelle 11: Oligonukleotide

Name	Sequenz	RS
Konstruktion von pNPTS138-R6KT		
<i>BssSI</i> -R6KT-for	GCA TCA CGA GCC TTA AGG TAT ACT TTC CGC TGC	<i>BssSI</i>
<i>DraIII</i> -R6KT-rev	GAA TCA CTA CGT GCC GGT TGT CAG CCG TTA AGT G	<i>DraIII</i>
In Frame Deletionen in <i>Shewanella</i> sp. Arc-kodierenden Genen und Komplementationen		
<i>XbaI</i> -ΔSO_0577-us-for	CGT CTA GAG CGT TGT TCG TTC ACG CTT GG	<i>XbaI</i>
ΔSO_0577-us-rev	ATG CTT GTG CTC TTC GCG CTG CTC CAT CT	
ΔSO_0577-ds-for	CGC GAA GAG CAC AAG CAT AAT CAC CGT TAA TTG	
	TTC	
<i>NcoI</i> -ΔSO_0577-ds-rev	ATC CAT GGC GTT TTT CAG CGG CAT CTT GGG	<i>NcoI</i>
ΔSO_0577-chk-for	CAG CGC AAA CCT GTA TCT GA	
ΔSO_0577-chk-rev	CAC GAG GTT GAT ACC CAT CC	
KI-So0577-Seq808-Fw	CGC AAC GGT TAC TAT ATC CAC TCG	
KI-So0577-Seq947-Rev	GTG CAC TAT GGT CAC CAG TAC CG	
KI-So0577-Seq1818-Fw	CGA TGC TTA CGA AAT CGA GTT CCG	
KI-So0577-Seq1939-Rev	GGT ACC AAC CAT ACG CTT AGG C	
KI-So0577-Seq2060-Rev	CGA TAA TGG CGT TCA TCG GCG	
KI-So0577-Seq2855-Fw	CTG AGG CAC TGT ACA AGT TGT CG	
KI-So0577-Seq3011-Rev	GCA AAG GCT CTG CCG CAT AGG	
<i>PspOMI</i> -ΔSO_1327-us-for	TAT AGG GCC CAA ACA CCG CTC GAT TAT ATG GCG	<i>PspOMI</i>
ΔSO_1327-us-rev	GCT TTA GCC TGT AAT TCA ACT GTG GCC ATC GAG G	
ΔSO_1327-ds-for	GTT GAA TTA CAG GCT AAA GCC TAA TTT GTT TCG C	
<i>EcoRI</i> -ΔSO_1327-ds-rev	CGA ATT CCT GAG TAG AAA CGG CGC AAT GG	<i>EcoRI</i>
SO_1327-chk-for	CGA TGT ATG GTT AGA GCT GGG C	
SO_1327-chk-rev	GCA TCG AGT AAA CGT TCC GTC G	
<i>BamHI</i> -ΔSO_3988-us-for	TGG ATC CAC GGC GTT TGA TAA TGC TGC C	<i>BamHI</i>
ΔSO_3988-us-rev	GCA GAA ACG GTG CGG ATT TTG CAT ATT AAG TAC CT	
ΔSO_3988-ds-for	AAT CCG CAC CGT TTC TGC GGT AAC TTA GAA GAC	
<i>PstI</i> -ΔSO_3988-ds-rev	CAT CTG CAG CCG ATT GGC GTT TGT ATG ACA CC	<i>PstI</i>
SO_3988-chk-for	GGG TTA TGG GCG GTA ATT ACA GC	
SO_3988-chk-rev	GCG ATT TAT GGC CAC AGC TAC G	
<i>Sall</i> -ΔSputCN32_3300-us-for	CTA GTC GAC TAC CCT CAA TGA CCT TCC CTT GC	<i>Sall</i>
ΔSputCN32_3300-us-rev	TCG AGT GAG TGG ATC CAG CAC AAG AAC CAG C	
ΔSputCN32_3300-ds-for	CTG GAT CCA CTC ACT CGA TTT CAT CCA CTA CCC	
<i>EcoRI</i> -SputCN32_3300-ds-rev	CGA ATT CAG TCG ATT AAC TTT ATG CGT GGC C	<i>EcoRI</i>
SputCN32_3300-chk-for	ACG TAA GCT GGA CAT CAA CAT CG	
SputCN32_3300-chk-rev	CGG GCA GTC TCA ATT ACA TTA TGG	
CN32-3300-Seq1016-Fw	AAG GCA TCG AAG AGT TTT TCC TGC	
CN32-3300-Seq1100-Rev	TGA ACT GGG TTG TGA GGA TGT CG	
CN32-3300-Seq2058-Fw	GCA ATT TGA GAG TAT CGA GTA ACA CG	
CN32-3300-Seq2206-Rev	ACA CCG AGA GTG AGA TGA TTG GC	
CN32-3300-Seq3101-Rev	CCT CAA TAA GAA ACA GTT CCA GTA TGC	
Überproduktion von <i>S. oneidensis</i> MR-1 Arc-Komponenten für in-vitro Untersuchungen an aufgereinigten Proteinen		
<i>BglII</i> -NOE-SO_0577-for	CAT GCA AGA TCT GTA CCC ATA AGG ATA TTA CCC	<i>BglII</i>
	GCC	
<i>HindIII</i> -SO_0577-rev	TCA AGC TTT TAA CGG TGA TTA TGC TTG TGT TTA	<i>HindIII</i>
	ATC	

Name	Sequenz	RS
<i>XmaI</i> -PAS-PAS-SO_0577-NOE-C-Term-Fw	ATC CCG GGA CTA CTG GTG AGC CGA ATT TTT GAG	<i>XmaI</i>
<i>XmaI</i> -SO_0577-NOE-C-Term-Fw	TGC CCG GGT ACC CAT AAG GAT ATT ACC CGC CAT A	<i>XmaI</i>
NotI-SO_0577-NOE-C-Term-Rev	CGG CCG CCG CTT AAC GGT GAT TAT GCT TGT GTT TAA TC	
<i>BglII</i> -NOE-arcA-for	CAG GTA CCT TAG TCT TCT AAG TTA CCG CAG AAA CG	<i>BglII</i>
<i>KpnI</i> -arcA-Rev	ACT GGA AGA TCT CGA TAT CGA TAT ATT TAG TTG ACG ATC ATG A	<i>KpnI</i>
<i>EcoRI</i> -hptA-for	CGA ATT CAT GGC CAC AGT TGA ATT AGA GAC AAT C	<i>EcoRI</i>
<i>XhoI</i> -hptA-rev	ACT CGA GTT AGG CTT TAG CCT GTA AGA ATT GC	<i>XhoI</i>
<i>XhoI</i> -SO_3457-181-for	TCT CGA GGC CGC CTT TAT TAT CGT GTT GAT TG	<i>XhoI</i>
<i>EcoRI</i> -SO_3457-C-Term-rev	CGA ATT CTT AAA GAA GCC CGT TTT TTT GGT CAT C	<i>EcoRI</i>
Seq33-Fw-100	GGC GTC CAC ACT TTG CTA TGC	
pBAD-HisA-rev	CAG TTC CCT ACT CTC GCA TG	
pGEX4T1-for	GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG	
pGEX4T1-rev	CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG	
Bacterial Two Hybrid Analyse im <i>S. oneidensis</i> MR-1 Arc-System		
pKT25-for	CAC TGA CGG CGG ATA TCG ACA TGT T	
pKT25-rev	CCG CCG GAC ATC AGC GCC ATT C	
pUT18-for	CCA GGC TTT ACA CTT TAT GCT TCC	
pUT18-rev	GAC GCG CCT CGG TGC CCA CTG C	
pKNT25-for	CCC AGG CTT TAC ACT TTA TGC TTC C	
pKNT25-rev	GTT TTT TTC CTT CGC CAC GGC CTT G	
pUT18C-for	CGG CGT GCC GAG CGG ACG TTC G	
pUT18C-rev	TCA GCG GGT GTT GGC GGG TGT C	
PAS-SO_0577-for	GTC TAG AGC TAC TGG TGA GCC GAA TTT TTG AG	<i>XbaI</i>
HisKA-SO_0577-for	GTC TAG AGG GTA CCC ATA AGG ATA TTA CCC GC	<i>XbaI</i>
Rec-SO_0577-rev	GAT CCC GGG AAC GGT GAT TAT GCT TGT GTT TAA TCC A	<i>XmaI</i>
Hpt-SO_1327-for	GTC TAG AGA TGG CCA CAG TTG AAT TAG AGA CAA T	<i>XbaI</i>
Hpt-SO_1327-rev	GAT CCC GGG AGG CTT TAG CCT GTA AGA ATT GCT TT	<i>XmaI</i>
HAMP-SO_3457-for	GTC TAG AGC TCG AAC AAC ACA GAG CCG C	<i>XbaI</i>
Hpt-SO_3457-rev	GAT CCC GGG ATT AAA GAA GCC CGT TTT TTT GGT CAT C	<i>XmaI</i>
ArcA-SO_3988-KT25-for	GAC CTG CAG TGC AAA ATC CGC ACA TTC TGA TCG	<i>PstI</i>
ArcA-SO_3988-for	GAC CTG CAG TAT GCA AAA TCC GCA CAT TCT GAT CG	<i>PstI</i>
ArcA-SO_3988-rev	CGG ATC CCA GTC TTC TAA GTT ACC GCA GAA ACG	<i>BamHI</i>
PAS-arcB- <i>E. coli</i> -for	GAT CCC GGG AAA GCG CAT CCT GAT ACC GCT T	<i>XmaI</i>
HisKA-arcB- <i>E. coli</i> -for	GAT CCC GGG ATC ATT TTT TAG TGG CTT TTG CCA CC	<i>XmaI</i>
Hpt-arcB- <i>E. coli</i> -rev	GTC TAG AGA CCG AGC GTA AGC GGT ATC AG	<i>XbaI</i>
<i>XbaI</i> -ArcS-BTH-Fw	CAT CTA GAG AAA TCG ACT GAG CCG GAT CTC	<i>XbaI</i>
<i>XmaI</i> -ArcS-BTH-Rev	AGC CCG GGA ACG GTG ATT ATG CTT GTG TTT AAT CCA	<i>XmaI</i>
<i>XmaI</i> -BTH-ArcS-HK-ATPase-Rev	ATC CCG GGT TTC AGG CAC AAC CAA AGG CTC G	<i>XmaI</i>
<i>XbaI</i> -BTH-ArcS-RecI-Fw	GCT CTA GAA AAA ACT CAA TAA CTT ACG TAC CCT GG	<i>XbaI</i>
<i>XmaI</i> -BTH-ArcS-RecI-Rev	ATC CCG GGG TAC GAC ATT GAG CCT TGG TTC	<i>XmaI</i>
<i>XbaI</i> -BTH-ArcS-RecII-Fw	GCT CTA GAT ACA GCC TAT CGC TGA AGT GGC	<i>XbaI</i>
In Frame Austausch spezifischer Reste oder Deletionen ausgewählter Sequenzen in <i>Shewanella</i> sp. Arc-kodierenden Genen		
SO0577-H683A-Fw	GAA TAT GAG CGC TGA AAT CCG TAC G	

Name	Sequenz	RS
SO0577-H683A-Rev	CGT ACG GAT TTC AGC GCT CAT ATT C	
SO0577-OL-D969N-Fw	GGC ATC ATC CAA TTG AGT AAT AAT AAA TCG	
SO0577-OL-D969N-Rev	CGA TTT ATT ATT ACT CAA TTG GAT GAT GCC	
SO_0577-OL-D969E-Fw	GAT TTA TTA TTA CTC GAG TGG ATG ATG CC	
SO_0577-OL-D969E-Rev	GGC ATC ATC CAC TCG AGT AAT AAT AAA TC	
SO0577-OL-D1114N-Fw	CTG GCA TCT GAA TAT TCA TTA ATA CCG	
SO0577-OL-D1114N-Rev	CGG TAT TAA TGA ATA TTC AGA TGC CAG	
SO_0577-OL-D1114E-Fw	CGG TAT TAA TGG AGA TTC AGA TGC CAG	
SO_0577-OL-D1114E-Rev	CTG GCA TCT GAA TCT CCA TTA ATA CCG	
hptA-OL-H62A-for	CTC GGA AGC CGC TAA ATT TAA AGG	
hptA-OL-H62A-rev	CCT TTA AAT TTA GCG GCT TCC GAG	
arcA-OL-D54N-for	ACC TCG TGG TTA TGA ACA TTA ACC	
arcA-OL-D54N-rev	GGT TAA TGT TCA TAA CCA CGA GGT	
arcA-OL-D54E-Fw	GGT TAA TCT CCA TAA CCA CGA GGT	
arcA-OL-D54E-Rev	ACC TCG TGG TTA TGA ACA TTA ACC	
ArcS-C483A-Fw	TAC CTC GGT GCT AAC AAG GCT GC	
ArcS-C483A-Rev	GCA GCC TTG TTA GCA CCG AGG TA	
ΔPASI-OL-Fw	CCT TGG TTC TCC GCA GAG CAG TTA CGC CT	
ΔPASI-OL-Rev	CTC TGC GGA GAA CCA AGG CTC CCA ACC TGG	
ΔPASII-OL-Fw	GAA GAC GGT GGT ACC CAT AAG GAT ATT ACC CGC	
ΔPASII-OL-Rev	ATG GGT ACC ACC GTC TTC TAC CGC ATC CAT AG	
KI-ArcS-N-His6-ds-Fw	CAC CAT CAC CAT CAC CAT AAA TCG ACT GAG CCG	
KI-ArcS-N-His6-ds-Rev	GAT CTC C	
KI-ArcS-N-His6-us-Fw	ATG GTG ATG GTG ATG GTG CAT CCA CTA CCC TTG	
KI-ArcS-N-His6-us-Rev	ATT GCA GC	
KI-HptA-N-His6-ds-Fw	CAC CAT CAC CAT CAC CAT GCC ACA GTT GAA TTA	
KI-HptA-N-His6-ds-Rev	GAG ACA ATC C	
KI-HptA-N-His6-us-Fw	ATG GTG ATG GTG ATG GTG CAT CGA GGC CTC CCT	
KI-HptA-N-His6-us-Rev	TAA GTA GT	
KI-ArcA-N-His6-ds-Fw	CAC CAT CAC CAT CAC CAT CAA AAT CCG CAC ATT	
KI-ArcA-N-His6-ds-Rev	CTG ATC GTT G	
KI-ArcA-N-His6-us-Fw	ATG GTG ATG GTG ATG GTG CAT ATT AAG TAC CTA	
KI-ArcA-N-His6-us-Rev	AAT TTT AAC CAA TAT TCT AAC	
PspOMI-In-ArcS-Fw	ATG GGC CCG TAG TGG ATG AAA TCG ACT GAG CC	PspOMI
His6-TAA-In-ArcS-Rev	CTT GAT AAA ACT TAT CGC TGC GAC CTT AAT GGT	
His6-TAA-In-ArcS-Fw	GAT GAT GGT GAT G	
His6-TAA-In-ArcS-Rev	CAT CAC CAT CAT CAC CAT TAA GGT CGC AGC GAT	
His6-TAA-In-ArcS-Fw	AAG TTT TAT CAA G	
Überexpressionen von <i>Shewanella</i> sp. Arc-kodierenden Genen		
SacI-RBS-SO_0577-for	TGA GCT CAG GAG GAT TTA TAT GGA GCA GCG CGA	
SacI-RBS-SO_0577-rev	AGA GC	SacI
XbaI-RBS-SO_0577-rev	GTC TAG ATT AAC GGT GAT TAT GCT TGT GTT TAA	
XbaI-RBS-SO_0577-for	TCC	XbaI
KpnI-RBS-SO_1327-for	CTG GTA CCA GGA GGA TTA CGA TGG CCA CAG TTG	
KpnI-RBS-SO_1327-rev	AAT TAG AG	KpnI
XbaI-SO_1327-rev	GTC TAG ATT AGG CTT TAG CCT GTA AGA ATT GC	XbaI
KpnI-RBS-SO_3988-for	CAG GTA CCA GGA GGA TAA AGA TGC AAA ATC CGC	
KpnI-RBS-SO_3988-rev	ACA TTC TGA TCG	KpnI
XbaI-RBS-SO_3988-rev	CGC TCT AGA TTA GTC TTC TAA GTT ACC GCA GAA	
XbaI-RBS-SO_3988-for	ACG	XbaI
SacI-NOE-ArcS(full)-Fw	GTG AGC TCA TGA AAT CGA CTG AGC CGG ATC T	SacI
BglII-NOE-ArcS(full)-Rev	CGC AGA TCT TTA ACG GTG ATT ATG CTT GTG TTT	
BglII-NOE-ArcS(full)-Fw	AAT CC	BglII

Name	Sequenz	RS
ΔCaChe-OL-Fw	AGC GTG TTT GTT TAC CAT ATC AGC CAG CGC ATT	
ΔCaChe-OL-Rev	ATG GTA AAC AAA CAC GCT GCG TTG CGG AT	
Überexpression von E. coli arcB in S. oneidensis MR-1 Δarc-Stämmen		
KpnI-RBS-ArcB(MG1655)-for	CGG TAC CAG GAG GTC CCT AAT GAA GCA AAT TCG TCT GC	KpnI
XbaI-ArcB (MG1655)-rev	ATC TAG AGC CGG GGT CAT TTT TTA GTG GC	XbaI
Überexpression von mxdABCD und Deletion von aggA		
BamHI-aggA-us-Fw	CGG ATC CGG TAA GTA AAG CGA TTA TCA CCT CC	BamHI
aggA-us-Rev	GCT CCT CCG CGT CTT ACT AAA GTC TTC ATG CAA A	
aggA-ds-Fw	GTA AGA CGC GGA GGA GCA AAT CAA TGA AAA CGT C	
EcoRI-aggA-ds-Rev	CGA ATT CGA GTC TGC TCT AAA ACA ATT GGA CG	EcoRI
aggA-chk-Fw	TTA AAG CAG CAT TAG ACG AAG CG	
aggA-chk-Rev	TCT GTT GCT GTA TCG TCA CCC G	
XbaI-mxD-A-D-Fw	GTC TAG ATT ATT CCA ACG GTT CAA CAC GCG	XbaI
KpnI-RBS-mxD-A-D-Rev	GCG GTA CCA GGA GGT TTT ATA TGA CAT CTA AAC TTT CTT TGA ATG C	KpnI
mxD-A-D-Seq1071-Fw	AAC ACT GCC GCC ATA TCC GC	
mxD-A-D-Seq1173-Rev	ACG CAA TTA CAA CAG CGT ATC GC	
mxD-A-D-Seq2034-Fw	GCA GGC GCT GTA ACA CTA AGG	
mxD-A-D-Seq2151-Rev	CGC CGA AGA TTT GGA TTT AAC CG	
mxD-A-D-Seq3114-Fw	ATC ACG GGT ATA ATT GCT ACA CGC	
mxD-A-D-Seq3214-Rev	CTG AAT GTA GAT GAG TTT TTA CGG GC	
Reporterplasmide zur Messung von Initialem Anheften		
BamHI-tacP-Fw	CGG ATC CGC GCA ACG CAA TTA ATG TAA GTT AG	BamHI
PstI-tacP-Rev	GAG CTG CAG ACA TTA TAC GAG CCG ATG ATT AAT TGT C	PstI
Transkriptionale Reporterfusionen		
PspOMI-PcsgAB-Fw	ATG GGC CCG TGA CTC CTT GCA TGT ATG GGT GT	PspOMI
PspOMI-PcsgAB-Rev	ATG GGC CCC GAG CGC TCT GCT TTA GTT GC	PspOMI
XbaI-PSO0577-Fw	AGTCT AGA GAC CTT TCG AGA TGA TAT GTT GTT CG	XbaI
PstI-PSO0577-Rev	TCC TGC AGC TGC TGG GTC TTC TGG CGG	PstI
XbaI-PSO_1326-Fw	GCT CTA GAG ACC TCA ACG AAA TTA CTA CTC GG	XbaI
PspOMI-PSO_1326-rev	ATG GGC CCT AGC TCG CCC GCC AAA TTT CAT	PspOMI
XbaI-PhptA-Fw	CGT CTA GAA AAC ACC GCT CGA TTA TAT GGC G	XbaI
PspOMI-PhptA-Rev	ATG GGC CCC GAG GCC TCC CTT AAG TAG TCC	PspOMI
PspOMI-ParcA-rev	GCG GGC CCA TTA AGT ACC TAA ATT TTA ACC AAT ATT CTA ACC	PspOMI
in Frame Deletionen in S. oneidensis MR-1 in SO_4444/SO_4445 sowie Komplementation der in Frame Deletionen		
dSO4444_dwnRev	CAC GGA TTA TGC ACA GCA ACA GGG CTT ATT C	
dSO4444_dwnFw	CCT GCT GGC AGC AAT AAA GTA ATC TTG CAA CC	
dSO4444_upFw	CAT AAT CCG TGA TAA TGT GAA CTT ATG GAT AC	
SacI-dSO4444_upRev	CGA GCT CGG AAT AGT GCA CCT CAT CAG TTA CTT G	SacI
RcsA-if-check-fw	GGT GTA ATA TGA GCG GCT AAA C	
RcsA-if-check-rv	CCT TAA GGG TCA CAC ATC AAC	
So4445-check-fw	GTT CAA CTG GGA TGG CAT ATT G	
So4445-check-rv	GAT GTT ACA GCA GGG TGT GC	
XbaI-RBS-SO4444Fw	GCT CTA GAC AGG AGT TGA ATA TGG CTT TTA AGA TC	XbaI
HindIII-SO4444Rev	GCA AGC TTT TAG AAT AAG CCC TGT TGC TGT G	HindIII
KpnI-RBS-SO4445Fw	AGG TAC CAG GAG GAT ATA GAT GAG TGC AAT TCA AAA AAT ACG	KpnI
Sall-SO4445Rev	CGA GTC GAC TCA GTT ACT TGT GTG GAT TAT GGC	Sall

Name	Sequenz	RS
Quantitative Realtime PCR of selected genes regulated by ArcS		
recA-Q-PCR-651-for	TCA CAT CAA CCG CAC CAG AAC G	
recA-Q-PCR-781-rev	CGC TCT TGA TCC TAT CTA CGC G	
csgA-Q-PCR-971-for	CGT ATT GTT TGA TAT CGC CGT CG	
csgA-Q-PCR-1109-rev	CAA TTA GGT GAG CTG AAC GAA AGC	
csgB-Q-PCR-249-for	TTG GTT TGC AGT TCC TTG CTG C	
csgB-Q-PCR-348-rev	TAT CTG ACA CCC ACC CAT GCG	
dmsA-Q-PCR-134-for	GTC ATC TTG CTT GGT TAA CTG TGG	
dmsA-Q-PCR-226-rev	GGT GGT TGC CAT ACT CAT CAT TGG	
dmsB-Q-PCR-113-for	CGA TGT GAT GAA TAA TGG TGT CGC	
dmsB-Q-PCR-219-rev	TAC AAC CAA TAG ACA TGT AGT AGG CAA	
aggA-Q-PCR-109-for	GCA CAC ACA CTC GAT ACA AAC CC	
aggA-Q-PCR-210-rev	CCA TAA CCA CCA GTG AGA TCA ACT	
SO_4179-Q-PCR-1050-for	GTA AAC CTG TTC GAT AAA GGA GTC G	
SO_4179-Q-PCR-PCR-1148-rev	TTT CGT GCA GAT CCC TCG GC	
SO_4180-Q-PCR-1197-for	ACA CTT ATC TTG TTC TTC AGC TTG C	
SO_4180-Q-PCR-1307-rev	ATT GGT CCC TGT CAT CAG CAC C	
rpoS-Q-PCR-819-for	TGT GGC ATC AAG ATT TTT TTG CAG G	
rpoS-Q-PCR-908-rev	TGA TAC CGC TGA GTT TGA TCT CG	
SO_2427-2009-Q-PCR-for	CTA CCG TTC ATA TCA AAC TGG AAG C	
SO_2427-2126-Q-PCR rev	GCG TTG AAA TCC TGA AAG ATG GC	
hptA-Q-PCR-Fw	GCT CGG AAG CCC ATA AAT TTA AAG G	
hptA-Q-PCR-Rev	CCC ACG TCG CGT GTT TTG ACT	
arcA-Q-PCR-Fw	ACC TCG TGG TTA TGG ACA TTA ACC T	
arcA-Q-PCR-Rev	CTT CGT TGT CAC GGC CTG TAA G	

8.1.9 Plasmide und Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 11 die verwendeten Plasmide in Tabelle 12 gelistet

Tabelle 12: Stammliste

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>Escherichia coli</i>		
DH5αpir	<i>recA1 gyrA (lacIZYA-argF) (80d lac [lacZ] M15) pir RK6</i>	(151)
WM3064	<i>thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZ ΔM15 RP4-1360</i>	W. Metcalf, University of Illinois, Urbana-Champaign
BTH101 ^a	<i>Δ(araBAD) 567ΔdapA 1341::[erm pir(wt)]</i> <i>F⁻, cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1 (Str^r), hsdR2, mcrA1, mcrB1</i>	EUROMEDEX, France
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1		
S79	<i>wild type</i>	(228)
Δ <i>arcS</i>	ΔSO_0577 (<i>arcS</i>)	Diese Arbeit
KI- <i>arcS</i>	<i>wild type</i> (Knock-in in ΔSO_0577)	Diese Arbeit
Δ <i>hptA</i>	ΔSO_1327 (<i>hptA</i>)	Diese Arbeit
KI- <i>hptA</i>	<i>wild type</i> (Knock-in in ΔSO_1327)	Diese Arbeit
Δ <i>arcA</i>	ΔSO_3988 (<i>arcA</i>)	Diese Arbeit
KI- <i>arcA</i>	<i>wild type</i> (Knock-in in ΔSO_3988)	Diese Arbeit
Δ <i>arcS</i> /Δ <i>hptA</i>	ΔSO_0577 ΔSO_1327	Diese Arbeit
Δ <i>arcS</i> /Δ <i>arcA</i>	ΔSO_0577 ΔSO_3988	Diese Arbeit
Δ <i>hptA</i> /Δ <i>arcA</i>	ΔSO_1327 ΔSO_3988	Diese Arbeit
Δ <i>arcS</i> /Δ <i>hptA</i> /Δ <i>arcA</i>	ΔSO_0577 ΔSO_1327 ΔSO_3988	Diese Arbeit
KI- <i>arcS</i> -HK _{H731A}	SO_0577 (H731A)	Diese Arbeit
KI- <i>arcS</i> -RecI _{D1017N}	SO_0577 (D1017N)	Diese Arbeit
KI- <i>arcS</i> -RecII _{D1162N}	SO_0577 (D1162N)	Diese Arbeit
KI- <i>arcS</i> -RecI+II _{D1017/1162N}	SO_0577 (D1017N;D1162N)	Diese Arbeit
KI- <i>arcS</i> -PAS _I _{C483A}	SO_0577 (C483A)	Diese Arbeit
KI- <i>arcS</i> -PAS _I _{Δ64-573}	SO_0577 (ΔPAS _{Δ64-573})	Diese Arbeit
KI- <i>arcS</i> -PAS _{II} _{Δ594-698}	SO_0577 (ΔPAS _{Δ594-698})	Diese Arbeit
KI- <i>hptA</i> _{H62A}	SO_1327 (H62A)	Diese Arbeit
KI- <i>arcA</i> _{D54N}	SO_3988 (D54N)	Diese Arbeit
KI- <i>arcA</i> _{D54E}	SO_3988 (D54E)	Diese Arbeit
ΔSO_4444	ΔSO_4444	Diese Arbeit
ΔSO_4445	ΔSO_4445	Diese Arbeit
ΔSO_4444/ΔSO_4445	ΔSO_4444 ΔSO_4445	Diese Arbeit
Δ <i>aggA</i>	ΔSO_4320	Diese Arbeit
Δ <i>arcS</i> /Δ <i>aggA</i>	ΔSO_0577 ΔSO_4320	Diese Arbeit
<i>Shewanella putrefaciens</i> CN-32		
S271	<i>wild type</i>	(64, 246)
S855	ΔSputCN32_3300 (<i>arcS</i>)	Diese Arbeit
S899	<i>wild type</i> (Knock-in in ΔSputCN32_3300)	Diese Arbeit

Tabelle 13: Plasmidliste

Plasmid	Genotyp	Quelle
Konstruktion of pNPTS138-R6KT		
pNPTS138		M.R.Alley, unveröffentlicht (37)
pUC18R6KT-mini-Tn7T		
pNPTS138-R6KT	Austausch des pUC origin von pNPTS138 durch einen γ -origin aus pUC18R6KT-mini-Tn7T	Diese Arbeit
In Frame Deletionen in <i>Shewanella sp.</i> Arc-kodierenden Genen und Komplementationen		
pGP704Sac28Km		Chengyen Wu, unveröffentlicht
pGP704Sac28Km- Δ arcS	SO_0577 (arcS) Deletionsfragment in pGP704Sac28Km	Diese Arbeit
pGP704Sac28Km-KI-arcS	SO_0577 (arcS) KI-Fragment in pGP704Sac28Km	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- Δ hptA	hptA Deletionsfragment in pNPTS138R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-KI-hptA	hptA KI-Fragment in pNPTS138R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- Δ arcA	arcA Deletionsfragment in pNPTS138R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-KI-arcA	arcA KI-Fragment in pNPTS138R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- Δ SputCN32_3300	SputCN32-3300 Deletionsfragment in pNPTS138R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-KI- SputCN32_3300	SputCN32_3300 KI-Fragment in pNPTS138R6KT	Diese Arbeit
Überproduktion von <i>S. oneidensis</i> MR-1 Arc-Komponenten für <i>in-vitro</i> Untersuchungen an aufgereinigten Proteinen		
pBAD-HisA		Invitrogen (82)
pBAD-HisA- arcS-694	SO_0577 C-terminal kodierende Region (aa 694-aa 1236) in pBAD-HisA	Diese Arbeit
pBAD-HisA- arcS-694-HK _{H731A}	SO_0577 (punktmutiert in H731 kodierendem Triplet) C-terminal kodierende Region (aa 694-aa 1236) in pBAD-HisA	Diese Arbeit
pBAD-HisA- arcS-694-HK _{H731A/D1017N}	SO_0577 (punktmutiert in H731 und D1017 kodierenden Triplets) C-terminal kodierende Region (aa 694-aa 1236) in pBAD-HisA	Diese Arbeit
pBAD-HisA- arcS-694 -HK _{H731A/D1162N}	SO_0577 (punktmutiert in H731 und D1162 kodierenden Triplets) C-terminal kodierende Region (aa 694-aa 1236) in pBAD-HisA	Diese Arbeit
pBAD-HisA- arcS-694 -HK _{H731A/D1017/1162N}	SO_0577 (punktmutiert in H731, D1017 und D1162 kodierenden Triplets) C-terminal kodierende Region (aa 694-aa 1236) in pBAD-HisA	Diese Arbeit
pBAD-HisA-arcA	arcA in pBAD-HisA	(82)
pBAD-HisA-arcA-D54N	arcA (punktmutiert in D54 kodierendem Triplet) in pBADHisA	(82)
pBAD-HisA-SO_3457-181	SO_3457 C-terminal coding region (aa181-aa 929) in pBADHisA	(82)
pGEX4T-1		
pGEX4T-1-hptA	hptA into pGEX4T-1	(82)
pGEX4T-1-hptA-H62A	hptA (punktmutiert in H62 kodierendem Triplet) in pGEX4T-1	(82)
pGEX4T-1-PAS-PAS-C-Term-arcS	SO_0577 C-terminal kodierende Region inklusive PAS-Domänen (aa 412-aa 1236)	Diese Arbeit
pGEX4T-1-C-Term-arcS	SO_0577 C-terminal kodierende Region (aa 694-aa 1236) (punktmutiert in D1017 kodierendem Triplets)	Diese Arbeit
pBAD33-HisA-ArcS-D1017E	SO_0577 C-terminal kodierende Region (aa 694-aa 1236) (punktmutiert in D1017 kodierendem Triplets)	
pBAD33-HisA-ArcS-D1162E	SO_0577 C-terminal kodierende Region (aa 694-aa 1236) (punktmutiert in D1162 kodierendem Triplets)	
pBAD33-HisA-ArcS-D1017/1162E	SO_0577 C-terminal kodierende Region (aa 694-aa 1236) (punktmutiert in D1017 und D1162 kodierenden Triplets)	
Bacterial Two Hybrid on <i>S. oneidensis</i> MR-1Arc-System		
pUT18		EUROMEDEX
pUT18C		EUROMEDEX
pKT25		EUROMEDEX
pKNT25		EUROMEDEX
pUT18-SO_0577-412	SO_0577 C-terminale kodierende Region (aa 412-aa 1236) in pUT18	(20)
pUT18C-SO_0577-412	SO_0577 C-terminale kodierende Region (aa 412-aa 1236) in pUT18C	(20)
pKT25-SO_0577-412	SO_0577 C-terminale kodierende Region (aa 412-aa 1236) in pKT25	(20)
pUT18-hptA	hptA in pUT18	(20)
pUT18C-hptA	hptA in pUT18C	(20)

Plasmid	Genotyp	Quelle
pKT25- <i>hptA</i>	<i>hptA</i> in pKT25	(20)
pKNT25- <i>hptA</i>	<i>hptA</i> in pKNT25	(20)
pUT18C- <i>arcA</i>	<i>arcA</i> in pUT18C	(20)
pKT25- <i>arcA</i>	<i>arcA</i> in pKT25	(20)
pKNT25- <i>arcA</i>	<i>arcA</i> in pKNT25	(20)
pUT18C-SO_3457-172	SO_3457 C-terminale kodierende Region (aa 172-aa 929) in pUT18C	(20)
pKT25-SO_3457-172	SO_3457 C-terminale kodierende Region (aa 172-aa 929) in pKT25	(20)
In Frame Austausch spezifischer Reste oder Deletionen ausgewählter Sequenzen in <i>Shewanella</i> sp. Arc-kodierenden Genen		
pGADT7-KI- <i>arcS</i> -HK _{H731A}	SO_0577 (<i>arcS</i>) KI-Fragment punktmutiert in H731 kodierendem Triplet in pGADT7	Diese Arbeit
pGADT7-KI- <i>arcS</i> -RecI _{D1017N}	SO_0577 (<i>arcS</i>) KI-Fragment punktmutiert in D1017 kodierendem Triplet in pGADT7	Diese Arbeit
pGADT7-KI- <i>arcS</i> -RecII _{D1162N}	SO_0577 (<i>arcS</i>) KI-Fragment punktmutiert in D1162 kodierendem Triplet in pGADT7	Diese Arbeit
pGADT7-KI- <i>arcS</i> -RecI+II _{D1017/1162N}	SO_0577 (<i>arcS</i>) KI-Fragment punktmutiert in D1017 und D1162 kodierenden Triplets in pGADT7	Diese Arbeit
pGP704Sac28Km-KI- <i>arcS</i> -HK _{H731A}	Umsetzen des KI-SO_0577(<i>arcS</i>)-Fragmentes aus pGADT7-KI- <i>arcS</i> -HK _{H731A} in pGP704Sac28Km	Diese Arbeit
pGP704Sac28Km-KI- <i>arcS</i> -RecI _{D1017N}	Umsetzen des KI-SO_0577(<i>arcS</i>)-Fragmentes aus pGADT7-KI- <i>arcS</i> -RecI _{D1017N} in pGP704Sac28Km	Diese Arbeit
pGP704Sac28Km-KI- <i>arcS</i> -RecII _{D1162N}	Umsetzen des KI-SO_0577(<i>arcS</i>)-Fragmentes aus pGADT7-KI- <i>arcS</i> -RecII _{D1162N} in pGP704Sac28Km	Diese Arbeit
pGP704Sac28Km-KI- <i>arcS</i> -RecI+II _{D1017/1162N}	Umsetzen des KI-SO_0577(<i>arcS</i>)-Fragmentes aus pGADT7-KI- <i>arcS</i> -RecI+II _{D1017/1162N} in pGP704Sac28Km	Diese Arbeit
pNPTS138-R6Km-KI- <i>arcS</i> -PAS _{I464-573}	SO_0577 (<i>arcS</i>) KI-Fragment punktmutiert in C483 kodierendem Triplet in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-KI- <i>arcS</i> -PAS _{I464-573}	SO_0577 (<i>arcS</i>) KI-Fragment um die PAS _{I464-573} kodierenden Triplets verkürzte Version in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-KI- <i>arcS</i> -PAS _{II594-698}	SO_0577 (<i>arcS</i>) KI-Fragment um die PAS _{II594-698} kodierenden Triplets verkürzte Version in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-KI- <i>hptA</i> _{H62A}	SO_1327 (<i>hptA</i>) KI-Fragment punktmutiert in H62 kodierendem Triplet in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-KI- <i>arcA</i> _{D54N}	SO_3988 (<i>arcA</i>) KI-Fragment punktmutiert in D54 (zu N) kodierendem Triplet in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-KI- <i>arcA</i> _{D54E}	SO_1327 (<i>arcA</i>) KI-Fragment punktmutiert in D54 (zu E) kodierendem Triplet in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-KI-His6- <i>arcS</i>	SO_0577 (<i>arcS</i>) KI-Fragment (nach dem Startcodon um 6 für His kodierende Triplets ergänzt) in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-KI-His6- <i>hptA</i>	SO_1327 (<i>hptA</i>) KI-Fragment (nach dem Startcodon um 6 für His kodierende Triplets ergänzt) in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-KI-His6- <i>arcA</i>	SO_3988 (<i>arcA</i>) KI-Fragment (nach dem Startcodon um 6 für His kodierende Triplets ergänzt) in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
Überexpressionen von <i>Shewanella</i> sp. Arc-kodierenden Genen		
pBAD33		(78)
pBAD33-RBS- <i>arcS</i>	SO_0577 (<i>arcS</i>) und artifizielle RBS in pBAD33	Diese Arbeit
pBAD33-RBS- <i>hptA</i>	<i>hptA</i> und artifizielle RBS in pBAD33	Diese Arbeit
pBAD33-RBS- <i>arcA</i>	<i>arcA</i> und artifizielle RBS in pBAD33	Diese Arbeit
pBAD33-RBS- <i>arcA</i> _{D54N}	<i>arcA</i> (punktmutiert in D54 (zu N) kodierendem Triplet) und artifizielle RBS in pBAD33	Diese Arbeit
pBAD33-RBS- <i>arcA</i> _{D54E}	<i>arcA</i> (punktmutiert in D54 (zu E) kodierendem Triplet) und artifizielle RBS in pBAD33	Diese Arbeit
pBAD33-HisA		N. Hess unveröffentlicht
pBAD33-HisA - <i>arcS</i> -HK _{H731A}	SO_0577 (<i>arcS</i>) Fragment punktmutiert in H731 kodierendem Triplet in pBAD33-HisA	Diese Arbeit
pBAD33-HisA - <i>arcS</i> -RecI _{D1017N}	SO_0577 (<i>arcS</i>) Fragment punktmutiert in D1017 kodierendem Triplet in pBAD33-HisA	Diese Arbeit
pBAD33-HisA - <i>arcS</i> -RecII _{D1162N}	SO_0577 (<i>arcS</i>) Fragment punktmutiert in D1162 kodierendem Triplet in pBAD33-HisA	Diese Arbeit
pBAD33-HisA - <i>arcS</i> -RecI+II _{D1017/1162N}	SO_0577 (<i>arcS</i>) Fragment punktmutiert in D1017 und D1162 kodierenden Triplets in pBAD33-HisA	Diese Arbeit
pBAD33-HisA - <i>arcS</i> -CaChe ₂₁₄₋₂₈₉	SO_0577 (<i>arcS</i>) Fragment um die CaChe ₂₁₄₋₂₈₉ kodierenden Triplets verkürzte Version in pBAD33-HisA	Diese Arbeit
pBAD33-HisA - <i>arcS</i> -PAS _{I464-573}	SO_0577 (<i>arcS</i>) Fragment um die PAS _{I464-573} kodierenden Triplets verkürzte Version in pBAD33-HisA	Diese Arbeit

Plasmid	Genotyp	Quelle
pBAD33-HisA - <i>arcS</i> -PASII ₅₉₄₋₆₉₈	SO_0577 (<i>arcS</i>) Fragment um die PASI ₅₉₄₋₆₉₈ kodierenden Triplets verkürzte Version in pBAD33-HisA	Diese Arbeit
Überexpression von <i>E. coli arcB</i> in <i>S. oneidensis</i> MR-1 Δ<i>arc</i>-Stämmen		
pBAD33- <i>arcB</i>	<i>arcB</i> (<i>E. coli</i> MG1655) und artifizielle RBS in pBAD33	Diese Arbeit
Lebendfluoreszenzmarkierung von <i>S. oneidensis</i> MR-1		
pBK-miniTn7-gfp3	ori-ColE1, gfp3, Ap ^r , Cm ^r , Gm ^r	(122)
miniTn7(Gm)P _{A1/04/03} -eyfp-a	ori-ColE1, eyfp, Ap ^r , Cm ^r , Gm ^r	(122)
miniTn7(Gm)P _{A1/04/03} -ecfp-a	ori-ColE1, ecfp, Ap ^r , Cm ^r , Gm ^r	(122)
pUC18-R6KT-miniTn7T		(37)
pUC18-R6KT-miniTn7T-egfp	NotI-egfp-Cm ^r -NotI Fragment aus pBK-miniTn7-gfp3 in pUC18-R6KT-miniTn7T	Diese Arbeit
pUC18-R6KT-miniTn7T-ecfp	NotI-ecfp-Cm ^r -NotI Fragment aus miniTn7(Gm)P _{A1/04/03} -ecfp-a in pUC18-R6KT-miniTn7T	Diese Arbeit
pUC18-R6KT-miniTn7T-eyfp	NotI-eyfp-Cm ^r -NotI Fragment aus miniTn7(Gm)P _{A1/04/03} -eyfp-a in pUC18-R6KT-miniTn7T	Diese Arbeit
Überexpression von <i>mxdABCD</i> und Deletion von <i>aggA</i>		
pNPTS138-R6KT- Δ <i>aggA</i>	SO_4320 (<i>aggA</i>) Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pBAD33-RBS- <i>mxdABCD</i>	<i>mxdABCD</i> und artifizielle RBS in pBAD33	Diese Arbeit
pBBR1-MCS5		(115)
pBBR1-MCS5-BAD-RBS- <i>mxdABCD</i>	Umsetzen der BAD-RBS- <i>mxdABCD</i> -Kassette in pBBR1-MCS5	Diese Arbeit
Reporterplasmide zur Messung von Initialem Anheften		
pBBR1-MCS3		(115)
pUC18-miniTn7T-Gm-Lux		(37)
pLacTac		(221)
pBBR1-MCS3-Lux	Klonierung der <i>luxCDABE</i> -Kassette aus pUC18-miniTn7T-Gm-Lux in pBBR1-MCS3	Diese Arbeit
pBBR1-MCS3-TacP-Lux	Klonierung der Tac-Promotorsequenz aus pLacTac in pBBR1-MCS3-Lux	Diese Arbeit
Transkriptionale Reporterfusionen		
pNPTS138R6KT-Lux	<i>luxCDABE</i> -Kassette aus pUC18-miniTn7T-Gm-Lux in pNPTS138R6KT	S.P. Bubendorfer unveröffentlicht
pBBR1-MCS5-Lux	<i>luxCDABE</i> -Kassette aus pUC18-miniTn7T-Gm-Lux in pBBR1-MCS3	S.P. Bubendorfer unveröffentlicht
pNPTS138R6KT-Lux-P _{csaAB}	Klonierung der Promotorsequenz für <i>csaAB</i> in pNPTS138R6KT-Lux	Diese Arbeit
pBBR1-MCS5-Lux- <i>ParcS</i>	Klonierung der Promotorsequenz für <i>arcS</i> in pBBR1-MCS5-Lux	Diese Arbeit
pBBR1-MCS5-Lux-PSO_1326	Klonierung der Promotorsequenz für SO_1326 in pBBR1-MCS5-Lux	Diese Arbeit
pBBR1-MCS5-Lux- <i>PhptA</i>	Klonierung der Promotorsequenz für <i>hptA</i> in pBBR1-MCS5-Lux	Diese Arbeit
pBBR1-MCS5-Lux- <i>ParcA</i>	Klonierung der Promotorsequenz für <i>arcA</i> in pBBR1-MCS5-Lux	Diese Arbeit
in Frame Deletionen in <i>S. oneidensis</i> MR-1 in SO_4444/SO_4445 sowie Komplementation der in Frame Deletionen		
pGP704Sac28Km- Δ SO_4444	SO_4444 Deletionsfragment in pGP704Sac28Km	(145) Diese Arbeit
pGP704Sac28Km- Δ SO_4445	SO_4445 Deletionsfragment in pGP704Sac28Km	(145) Diese Arbeit
pGP704Sac28Km- Δ SO_4444/ Δ SO4445	SO_4444/SO_4445 Deletionsfragment in pGP704Sac28Km	Diese Arbeit
pBAD33-RBS-SO_4444	SO_4444 und artifizielle RBS in pBAD33	Diese Arbeit
pBAD33-RBS-SO_4445	SO_4445 und artifizielle RBS in pBAD33	Diese Arbeit
pGP704Sac28Km-KI-SO_4444	SO_4444 KI-Fragment in pGP704Sac28Km	Diese Arbeit
pGP704Sac28Km-KI- Δ SO4445	SO_4445 KI-Fragment in pGP704Sac28Km	Diese Arbeit
pARA-VCA0956		(221)

8.2 Methoden

8.2.1 Bakterielle Stämme und Wachstumsbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Stämme sind in Tabelle 11 und 12 aufgeführt. *S. oneidensis* MR-1, *S. putrefaciens* CN-32 wurden gewöhnlich aerob in LB bei 30°C (*S. oneidensis* MR-1 und *S. putrefaciens* CN-32) oder 37°C (*E. coli*) kultiviert. Spezielle Versuche mit *Shewanella* wurden darüber hinaus in 4M oder LM durchgeführt. Wann immer emerses Wachstum notwendig war, wurde den entsprechenden Medien 1,5% Agar zugesetzt.

Anaerobe Wachstumskinetiken wurden in LB oder 4M unter Zusatz von 40 mM Lactat und 40 mM DMSO respektive 40 mM Fumarat aufgenommen. Zur Eliminierung von Sauerstoff wurden Kulturflaschen gestopft und versiegelt. Darüber hinaus wurde die Atmosphäre in den Kulturflaschen durch reinen Stickstoff ersetzt (9).

Die Überwachung des Wachstums erfolgte stets durch Streumessungen im Photometer bei 600 nm.

8.2.2 Konstruktion rekombinanter Bakterienstämme

Molekularbiologische Methoden wurden entsprechend Standardprotokollen (184, 200) oder den Anweisungen der Hersteller folgend durchgeführt. Die verwendeten Enzyme, Puffer, Kits und Chemikalien sind unter 10.1.2-4 gesondert gelistet.

Transfer replikativer Plasmide

Replikative Plasmide wurden mittels Transformation in chemisch kompetente *E. coli* (91) oder elektrokompente Shewanellen (157) transferiert.

in Frame Deletionen

In Frame Deletionsmutanten in *Shewanella* wurden unter Verbleib kleiner terminaler Gensequenzen (je 10-25bp) konstruiert ((221, 223). Stromaufwärts und stromabwärts gelegene Sequenzen (je ca. 500bp) des zu deletierenden Gens wurden hierzu in einer 1. PCR amplifiziert, danach gereinigt und in einer 2. PCR miteinander fusioniert (205). Das so entstandene Überlappfragment wurde nach Restriktion mit dem Suizidvektor pGP704Sac28KM oder pNPTS138-R6KT ligiert. Der resultierende Vektor wurde nun zuerst in *E. coli* DH5 α *λpir* transferiert, bevor er anschließend in einer 2. Transformation in den DAP auxotrophen *E. coli* WM3064 überführt wurde. Per konjugativer Paarung auf LB-Agar unter Zusatz von 300 μ M DAP erfolgte die Einschleusung in *Shewanella* und dort die orstspezifische Integration des Plasmids in das Genom. Die Selektion der Bakterien mit chromosomal-integriertem Plasmid (1. Homologe Rekombination) fand durch Wachstum auf LB-Agar unter Zusatz von Kanamycinsulfat statt. Im nächsten Schritt wurden Einzelkolonien ohne Selektionsdruck in LB ÜN angezogen. Am nächsten Tag erfolgte die Selektion auf „plasmid“-freie Stämme durch Wachstum auf LB-Agar unter Zusatz von 10% Saccharose. Saccharoseresistente aber Kanamycinsensitive Stämme wurden im letzten Schritt mittels PCR auf Deletion des gewünschten Genabschnittes untersucht.

in Frame Komplementationen

Als in Frame Komplementation wurde die Wiedereinführung des Gens in die Deletionsmutante analog der eben beschriebenen Methode zur Erzeugung von in Frame Deletionen bezeichnet.

Genortsspezifische Mutagenese

Für den gerichteten Austausch einzelner Basenpaare bzw. die Deletion oder Insertion kurzer DNA-Fragmente kam die überlappende Extensions-PCR (2) zum Einsatz. Die Überführung der Amplifikate in die entsprechenden Vektoren und dann die Stämme erfolgte mittels der oben beschriebenen Techniken.

8.2.3 Erstellung von Expressionsprofilen

Expressionsprofile für *S. oneidensis* MR-1 wurden in Zusammenarbeit mit Febit (Febit Biomed GmbH, Heidelberg) erstellt. Für jeden zu untersuchenden Stamm erfolgte die Analyse dreier unabhängiger Replikate.

Oligonukleotidsonden wurden durch lichtaktivierte *in situ* Synthese hergestellt (10). Ein Biochip bestand hierbei aus acht individuellen Microfluid-Kanälen, mit je >15.000 DNA-Sonden. Dabei wurde das SONDENSET anhand des Gesamtgenoms von *S. oneidensis* (TIGR 4. Juni 2008) mittels eines modifizierten Smith-Waterman-Algorithmus berechnet (210). Für fast alle der 4.770 annotierten Gene in *S. oneidensis* MR-1 kamen so drei 50-mer Oligonukleotidsonden zum Einsatz.

Die Qualitätskontrolle der RNA erfolgte mithilfe des Bioanalyzers 2100 (Agilent, Böblingen) und dem RNA 6000 Nanokit, entsprechend Herstellerangaben. Im Anschluss wurde aus 3µg Total-RNA die 16 S und 23 S rRNA mit dem MICROBEExpress Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) entfernt. Die verbleibende mRNA wurde mit dem AmpTMII-Bacteria Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) biotinyliert, getrocknet, in 15µl Longmer Hybridisierungspuffer (Febit Biomed GmbH, Heidelberg) resuspendiert und auf den Biochip aufgetropft. Die Hybridisierung erfolgte für 16h bei 45°C mit Argon Druckluft. Die nichthybridisierte RNA wurde durch Waschen entfernt und die verbleibenden Signale nach Herstellerangaben verstärkt (Febit Biomed GmbH, Heidelberg).

Datenanalyse

Die detektierten Signale wurden mittels Geniom Wizard Software (Febit Biomed GmbH, Heidelberg) evaluiert. Es folgte die Korrektur auf den Hintergrund sowie eine quantile Normalisierung. Die so berechneten Intensitäten wurden auf Normalverteilung überprüft und einem parametrischen T-Test - zur Feststellung signifikanter Expressionsunterschiede zwischen den zu vergleichenden Stämmen – unterzogen. Die resultierenden P-Wertes wurden im Benjamini-Hochberg-Verfahren angepasst (86, 111). Für eine signifikante statistische Aussage wurden alle Daten mit einem P Value >0,05 ausgeschlossen.

8.2.4 Quantitative Realtime-PCR

Extrahierte Total-RNA diente als Matrize zur cDNA-Synthese mit dem Revert Aid™ H Minus first strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon-Roth). Die cDNA ihrerseits wurde quantitativ auf das Vorhandensein der entsprechenden Sequenzen untersucht. Dabei erfolgte die Amplifikation und Detektion der entsprechenden DNA-Sequenzen mit dem SYBR® Green PCR-Mastermix (Applied Biosystems, Darmstadt). Die Bestimmung der zur cDNA korrespondierenden Transkriptmengen erfolgte mindestens als Duplikat. Bei der Auswertung der SYBR® Green Signale kam die Realtime 7300 PCR Software (Amersham, Freiburg). Der entsprechende ct-Wert wurde dabei automatisch bestimmt nach einem 2-Schritt-Zyklus mit 40 Wiederholungen. Die Standardisierung der RNA auf die eingesetzte Menge erfolgte auf die Transkriptmenge von *recA*. Die Primerqualität wurde anhand von Dissoziationskurven der Amplifikate ermittelt und die Primereffizienz unter Einsatz definierter Mengen chromosomaler DNA (10 µg/l, 1 µg/l, 0,1 µg/l, 0,01 µg/l) als Matrize für eine Q-RT-PCR bestimmt.

8.2.5 Überproduktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Überproduktion

His₆-ArcS (katalytisch), His₆-ArcA und His₆-BarA wurden wie die zugehörigen punktmutierten Derivate in *E. coli* DH5α*pir* - als Träger des entsprechenden Überexpressionsplasmids - überproduziert. Die Anzucht erfolgte in SOB bei 37°C. Nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase wurden zur Induktion der Proteinüberproduktion final 0,2% L-Arabinose zugesetzt. Im Gegensatz dazu wurden GST-HptA sowie GST-ArcS (sensorisch + katalytisch) – Proteine mit final 1mM IPTG induziert. Nach 4h Wachstum unter Induktionsbedingungen erfolgte die Zellernte.

Aufreinigung

Zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine (100) wurden die Proteine in Lyse-Puffer resuspendiert und anschließend durch drei Passagen in einer French-Press (SLM, Aminco, Spectronic) mit 1200 Bar aufgeschlossen. Durch Zentrifugation für 1h bei 4°C und 35.000g erfolgte die Trennung der löslichen Proteine (Überstand) von Zelltrümmern und der Membranfraktion (Pellet).

Nach Herstellerangaben wurden die rekombinanten Proteine in einer Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dabei kamen entweder 1ml Ni-Nitrilotriacetic Acid (Ni-NTA) Superflow (Quiagen, Hilden) für His₆-Proteine oder 1ml GST-Bind-Resin (Invitrogen, Darmstadt) für GST-Fusionsproteine zum Einsatz. Die Proteinenthaltenden Elutionen wurden zusammengefasst und gegen TGMNKD-Puffer dialysiert (190). Für weitere Analysen der Proteine erfolgte die Lagerung Kurzzeit bei 4°C oder Langzeit bei -80°C.

8.2.6 *in vitro* Autophosphorylierungs- und Phosphogruppentransferstudien

Autophosphorylierung des RR ArcA

Zur Autophosphorylierung von ArcA wurden 10µM Protein in TGMNKD-Puffer zusammen mit äquimolaren Mengen [³²P]-Acetylphosphat für 30 min bei 30°C inkubiert (100). Dabei wurde radioaktives Acetylphosphat in einer enzymatischen Reaktion der Acetatkinase mit ATP synthetisiert, wie beschrieben unter (100).

Autophosphorylierung der HK ArcS und BarA

Zur Autophosphorylierung von ArcS wurden 10µM Protein in TGMNKD-Puffer zusammen mit äquimolaren Mengen [³²P]-ATP über eine definierte Zeit inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion setzte man 5x Protein-Ladepuffer zu.

Phosphogruppentransfer zwischen ArcS, HptA, und ArcA sowie BarA

Autophosphoryliertes ArcA wurde hierzu zusammen mit HptA, ArcS und BarA in den entsprechenden Kombinationen für 1min bei 30°C inkubiert und anschließend mit 5x Protein-Ladepuffer versetzt.

Auswertung der Phosphorylierungsreaktionen

Zur Analyse der Phosphorylierungsreaktionen wurden die Proben auf ein SDS-Polyagrylamidgel geladen und im elektrischen Feld nach Größe aufgetrennt (200). Im Anschluss akkumulierte man das radioaktive Signal auf einem γ-Strahlungssensitiven Film und visualisierte dieses mit Hilfe eines PhosphorImagers. Die Größenzuordnung der Banden erfolgte durch Vergleich mit den Coomassiegefärbten SDS-Polyagrylamidgelen.

8.2.7 Westen-Blot Analysen

Zur Detektion von ArcS und ArcS-Derivaten nach ektoischer Überproduktion wurden Zellen der entsprechenden Stämme analog Paulick *et al.* (174) behandelt, aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Membranen mit Ms mAb to 6x His (Abcam) entsprechend Anweisungen des Herstellers. Das Signal wurde mit CDP-Star (NEB) entsprechend Herstellerangaben entwickelt und dokumentiert.

8.2.8 Biofilmbildung

Lebendfluoreszenzmarkierung

Zur Lebendfluoreszenzmarkierung von *S. oneidensis* MR-1 wurden die entsprechenden Stämme analog der Beschreibung aus Gödeke *et al.* (73) behandelt.

Hydrodynamisches Flusskammersystem

Die Biofilmbildung erfolgte bei RT in LM in einem Drei-Kanal-Flusskammersystem. Jeder Kanal maß dabei 1 x 4 x 40 mm. Deckgläschen (Roth, Karlsruhe) dienten dabei als Anheftungsoberfläche für die Zellen. Mittels Silikon (Siska-Henkel, Düsseldorf) wurden diese auf den Flusskammern befestigt und für 24h vor Nutzung bei RT getrocknet. Der Zusammenbau, die Sterilisation und die Beimpfung mit Kultur erfolgte wie unter (223) beschrieben. Die Aufnahme der Biofilme erfolgte am Konfokalen-Fluoreszenzmikroskop im biologischen Triplikat und wurde mindestens einmal wiederholt. Die Daten wurden anschließend mit Imaris (Bitplane AG, Zürich) ausgewertet.

Statischer Mikrotiterplatten-Schnelltest

Zur Untersuchung der Biofilmbildung in Flachboden-Mikrotiterplatten aus Polypropylen im 96 Kammerformat (Sarstedt, Nümbrecht) wurden 150 µl LB mit 1×10^7 Zellen einer logarithmisch wachsenden Shewanellen-Kultur beimpft und für 24 h bei 30°C inkubiert. Die Färbung der Biofilme erfolgte durch Zugabe von final 0,015 % Kristallviolett und anschließender Inkubation für 10 min. Nicht in den Biofilm inkorporierter Farbstoff wurde durch zweimaliges Waschen mit Wasser entfernt. Das verbleibende Kristallviolett eluierte mit Ethanol und wurde durch eine Extinktionsmessung bei 570 nm quantifiziert. Zum Ausschluss von Wachstumsdefekten normalisierte man die Menge an Kristallviolet mit der optischen Dichte der Kultur bei 600 nm (223).

8.2.9 Motilität

Zur Untersuchung der Motilität von *S. oneidenis* MR-1 wurden 3 µl des entsprechenden Stammes auf LB-Weichagarplatten (174) getropft und für 24 h bei 30°C inkubiert. Im Anschluss wurde der Grad der Motilität durch Messung der Schwimmradien bestimmt.

9 Quellen

1. **Abel, T., and T. Maniatis.** 1989. Gene regulation. Action of leucine zippers. *Nature* **341**:24-5.
2. **Aiyar, A., Y. Xiang, and J. Leis.** 1996. Site-directed mutagenesis using overlap extension PCR. *Methods Mol Biol* **57**:177-91.
3. **Allen, P., C. A. Hart, and J. R. Saunders.** 1987. Isolation from *Klebsiella* and characterization of two *rcs* genes that activate colanic acid capsular biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **133**:331-40.
4. **Alon, U.** 2007. Network motifs: theory and experimental approaches. *Nature Reviews Genetics* **8**:450-461.
5. **Anantharaman, V., and L. Aravind.** 2000. Cache - a signaling domain common to animal Ca²⁺ channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors. *Trends in Biochemical Sciences* **25**:535-537.
6. **Ashby, M. K.** 2006. Distribution, structure and diversity of "bacterial" genes encoding two-component proteins in the Euryarchaeota. *Archaea* **2**:11-30.
7. **Ashby, M. K.** 2004. Survey of the number of two-component response regulator genes in the complete and annotated genome sequences of prokaryotes. *Fems Microbiology Letters* **231**:277-281.
8. **Babu, M. M., S. A. Teichmann, and L. Aravind.** 2006. Evolutionary dynamics of prokaryotic transcriptional regulatory networks. *Journal of Molecular Biology* **358**:614-633.
9. **Balch, W. E., and R. S. Wolfe.** 1976. New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminantium* in a pressureized atmosphere. *Appl Environ Microbiol* **32**:781-91.
10. **Baum, M., S. Bielau, N. Rittner, K. Schmid, K. Eggelbusch, M. Dahms, A. Schlauersbach, H. Tahedl, M. Beier, R. Guimil, M. Scheffler, C. Hermann, J. M. Funk, A. Wixmerten, H. Rebscher, M. Honig, C. Andreae, D. Buchner, E. Moschel, A. Glathe, E. Jager, M. Thom, A. Greil, F. Bestvater, F. Obermeier, J. Burgmaier, K. Thome, S. Weichert, S. Hein, T. Binnewies, V. Foitzik, M. Muller, C. F. Stahler, and P. F. Stahler.** 2003. Validation of a novel, fully integrated and flexible microarray benchtop facility for gene expression profiling. *Nucleic Acids Res* **31**:e151.
11. **Baumann, L., P. Baumann, R. D. Allen, and M. Mandel.** 1972. Taxonomy of Aerobic Marine *Eubacteria*. *Journal of Bacteriology* **110**:402-408.
12. **Beavo, J. A., and L. L. Brunton.** 2002. Cyclic nucleotide research - still expanding after half a century. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**:710-718.
13. **Bekker, M., S. Alexeeva, W. Laan, G. Sawers, J. T. de Mattos, and K. Hellingwerf.** 2010. The ArcBA two-component system of *Escherichia coli* is regulated by the redox state of both the Ubiquinone and the Menaquinone pool. *Journal of Bacteriology* **192**:746-754.
14. **Beliaev, A. S., and D. A. Saffarini.** 1998. *Shewanella putrefaciens mtrB* encodes an outer membrane protein required for Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Journal of Bacteriology* **180**:6292-6297.
15. **Beliaev, A. S., D. A. Saffarini, J. L. McLaughlin, and D. Hunnicutt.** 2001. MtrC, an outer membrane decahaem c cytochrome required for metal reduction in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Molecular Microbiology* **39**:722-730.
16. **Beliaev, A. S., D. K. Thompson, M. W. Fields, L. Y. Wu, D. P. Lies, K. H. Nealson, and J. Z. Zhou.** 2002. Microarray transcription profiling of a *Shewanella oneidensis etrA* mutant. *Journal of Bacteriology* **184**:4612-4616.
17. **Berkner, S., D. Grogan, S. V. Albers, and G. Lipps.** 2007. Small multicopy, non-integrative shuttle vectors based on the plasmid pRN1 for *Sulfolobus acidocaldarius* and *Sulfolobus solfataricus*, model organisms of the (cren-)archaea. *Nucleic Acids Res* **35**:e88.
18. **Bertani, G.** 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**:293-300.
19. **Bignell, C., and C. M. Thomas.** 2001. The bacterial ParA-ParB partitioning proteins. *J Biotechnol* **91**:1-34.
20. **Binnenkade, L.** 2010. Characterization of an atypical Arc two-component regulatory system in *Shewanella oneidensis* MR-1: a bacterial two-hybrid analysis.
21. **Borneman, A. R., T. A. Gianoulis, Z. D. Zhang, H. Yu, J. Rozowsky, M. R. Seringhaus, L. Y. Wang, M. Gerstein, and M. Snyder.** 2007. Divergence of transcription factor binding sites across related yeast species. *Science* **317**:815-9.

22. **Botsford, J. L., and J. G. Harman.** 1992. Cyclic-Amp in Prokaryotes. *Microbiological Reviews* **56**:100-122.
23. **Bouhenni, R., A. Gehrke, and D. Saffarini.** 2005. Identification of genes involved in cytochrome c biogenesis in *Shewanella oneidensis*, using a modified mariner transposon. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:4935-4937.
24. **Boukhalfa, H., G. A. Icopini, S. D. Reilly, and M. P. Neu.** 2007. Plutonium(IV) reduction by the metal-reducing bacteria *Geobacter metallireducens* GS15 and *Shewanella oneidensis* MR1. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:5897-5903.
25. **Bowman, J. P., S. A. McCammon, D. S. Nichols, J. H. Skerratt, S. M. Rea, P. D. Nichols, and T. A. McMeekin.** 1997. *Shewanella gelidimarina* sp. nov. and *Shewanella frigidimarina* sp. nov., novel Antarctic species with the ability to produce eicosapentaenoic acid (20:5 omega 3) and grow anaerobically by dissimilatory Fe(III) reduction. *Int J Syst Bacteriol* **47**:1040-7.
26. **Brandon, L., S. Dorus, W. Epstein, K. Altendorf, and K. Jung.** 2000. Modulation of KdpD phosphatase implicated in the physiological expression of the kdp ATPase of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **38**:1086-92.
27. **Brettar, I., E. R. Moore, and M. G. Hofle.** 2001. Phylogeny and Abundance of Novel Denitrifying Bacteria Isolated from the Water Column of the Central Baltic Sea. *Microb Ecol* **42**:295-305.
28. **Buckland, R., and F. Wild.** 1989. Leucine zipper motif extends. *Nature* **338**:547.
29. **Burbulys, D., K. A. Trach, and J. A. Hoch.** 1991. Initiation of Sporulation in *Bacillus subtilis* Is Controlled by a Multicomponent Phosphorelay. *Cell* **64**:545-552.
30. **Caccavo, F., R. P. Blakemore, and D. R. Lovley.** 1992. A Hydrogen-Oxidizing, Fe(III)-Reducing Microorganism from the Great Bay Estuary, New-Hampshire. *Applied and Environmental Microbiology* **58**:3211-3216.
31. **Camilli, A., and B. L. Bassler.** 2006. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* **311**:1113-1116.
32. **Campbell, N. A., and R. J. B.** 2003. *Biologie*, vol. 6. Spektrum Akademischer Verlag.
33. **Carpentier, W., K. Sandra, I. De Smet, A. Brige, L. De Smet, and J. Van Beeumen.** 2003. Microbial reduction and precipitation of vanadium by *Shewanella oneidensis*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:3636-3639.
34. **Castanie-Cornet, M. P., H. Treffandier, A. Francez-Charlot, C. Gutierrez, and K. Cam.** 2007. The glutamate-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*: essential and dual role of the His-Asp phosphorelay RcsCDB/AF. *Microbiology* **153**:238-46.
35. **Charania, M. A., K. L. Brockman, Y. Zhang, A. Banerjee, G. E. Pinchuk, J. K. Fredrickson, A. S. Beliaev, and D. A. Saffarini.** 2009. Involvement of a membrane-bound class III adenylate cyclase in regulation of anaerobic respiration in *Shewanella oneidensis* MR-1. *J Bacteriol* **191**:4298-306.
36. **Chen, Y. E., C. G. Tsokos, E. G. Biondi, B. S. Perchuk, and M. T. Laub.** 2009. Dynamics of two Phosphorelays controlling cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **191**:7417-29.
37. **Choi, K. H., J. B. Gaynor, K. G. White, C. Lopez, C. M. Bosio, R. R. Karkhoff-Schweizer, and H. P. Schweizer.** 2005. A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat Methods* **2**:443-8.
38. **Coleman, M., R. Pearce, E. Hitchin, F. Busfield, J. W. Mansfield, and I. S. Roberts.** 1990. Molecular cloning, expression and nucleotide sequence of the rcsA gene of *Erwinia amylovora*, encoding a positive regulator of capsule expression: evidence for a family of related capsule activator proteins. *J Gen Microbiol* **136**:1799-806.
39. **Compan, I., and D. Touati.** 1994. Anaerobic activation of *arcA* transcription in *Escherichia coli*: roles of Fnr and ArcA. *Mol Microbiol* **11**:955-64.
40. **Core, L., and M. Perego.** 2003. TPR-mediated interaction of RapC with ComA inhibits response regulator-DNA binding for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **49**:1509-22.
41. **Cruz-Garcia, C., A. E. Murray, J. A. Klappenbach, V. Stewart, and J. M. Tiedje.** 2007. Respiratory nitrate ammonification by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Journal of Bacteriology* **189**:656-662.
42. **Dailey, F. E., and H. C. Berg.** 1993. Change in direction of flagellar rotation in *Escherichia coli* mediated by acetate kinase. *J Bacteriol* **175**:3236-9.
43. **Dale, J. R., R. Wade, and T. J. DiChristina.** 2007. A conserved histidine in cytochrome c maturation permease CcmB of *Shewanella putrefaciens* is required for anaerobic growth below a threshold standard redox potential. *Journal of Bacteriology* **189**:1036-1043.

44. **Danese, P. N., W. B. Snyder, C. L. Cosma, L. J. Davis, and T. J. Silhavy.** 1995. The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP. *Genes Dev* **9**:387-98.
45. **De Windt, W., H. C. Gao, W. Kromer, P. Van Damme, J. Dick, J. Mast, N. Boon, J. Z. Zhou, and W. Verstraete.** 2006. AggA is required for aggregation and increased biofilm formation of a hyper-aggregating mutant of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Microbiology-Sgm* **152**:721-729.
46. **Delong, E. F., D. G. Franks, and A. A. Yayanos.** 1997. Evolutionary relationships of cultivated psychrophilic and barophilic deep-sea bacteria. *Appl Environ Microbiol* **63**:2105-8.
47. **Deng, W., V. Burland, G. Plunkett, 3rd, A. Boutin, G. F. Mayhew, P. Liss, N. T. Perna, D. J. Rose, B. Mau, S. Zhou, D. C. Schwartz, J. D. Fetherston, L. E. Lindler, R. R. Brubaker, G. V. Plano, S. C. Straley, K. A. McDonough, M. L. Nilles, J. S. Matson, F. R. Blattner, and R. D. Perry.** 2002. Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. *J Bacteriol* **184**:4601-11.
48. **Derby, H., and B. Hammer.** 1931. Bacteriology of butter. IV. Bacteriological studies of surface taint butter. IOWA Agricultural Experiment Station Research Bulletin **145**:387-416.
49. **Deretic, V., J. H. Leveau, C. D. Mohr, and N. S. Hibler.** 1992. In vitro phosphorylation of AlgR, a regulator of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*, by a histidine protein kinase and effects of small phospho-donor molecules. *Mol Microbiol* **6**:2761-7.
50. **Dermitzakis, E. T., and A. G. Clark.** 2002. Evolution of transcription factor binding sites in Mammalian gene regulatory regions: conservation and turnover. *Mol Biol Evol* **19**:1114-21.
51. **Disabato, G., and W. P. Jencks.** 1961. Mechanism and Catalysis of Reactionsof Acyl Phosphates .2. Hydrolysis. *Journal of the American Chemical Society* **83**:4400-&.
52. **Dong, J. M., J. S. Taylor, D. J. Latour, S. Iuchi, and E. C. Lin.** 1993. Three overlapping *lct* genes involved in L-lactate utilization by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**:6671-8.
53. **Doniger, S. W., and J. C. Fay.** 2007. Frequent gain and loss of functional transcription factor binding sites. *PLoS Comput Biol* **3**:e99.
54. **Dorman, C. J.** 2009. Regulatory integration of horizontally-transferred genes in bacteria. *Front Biosci* **14**:4103-12.
55. **Drury, L. S., and R. S. Buxton.** 1985. DNA sequence analysis of the *dye* gene of *Escherichia coli* reveals amino acid homology between the dye and OmpR proteins. *J Biol Chem* **260**:4236-42.
56. **Duerig, A., S. Abel, M. Folcher, M. Nicollier, T. Schwede, N. Amiot, B. Giese, and U. Jenal.** 2009. Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression. *Genes Dev* **23**:93-104.
57. **Farrenkopf, A. M., M. E. Dollhopf, S. NiChadhain, G. W. Luther, and K. H. Nealson.** 1997. Reduction of iodate in seawater during Arabian Sea shipboard incubations and in laboratory cultures of the marine bacterium *Shewanella putrefaciens* strain MR-4. *Marine Chemistry* **57**:347-354.
58. **Fass, E., and E. A. Groisman.** 2009. Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr Opin Microbiol* **12**:199-204.
59. **Ferrieres, L., and D. J. Clarke.** 2003. The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface. *Molecular Microbiology* **50**:1665-1682.
60. **Fischer, C., C. Geourjon, C. Bourson, and J. Deutscher.** 1996. Cloning and characterization of the *Bacillus subtilis* *prkA* gene encoding a novel serine protein kinase. *Gene* **168**:55-60.
61. **Flemming, H. C., and J. Wingender.** 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**:623-33.
62. **Forst, S. A., and D. L. Roberts.** 1994. Signal transduction by the EnvZ-OmpR phosphotransfer system in bacteria. *Res Microbiol* **145**:363-73.
63. **Fredrickson, J. K., M. F. Romine, A. S. Beliaev, J. M. Auchtung, M. E. Driscoll, T. S. Gardner, K. H. Nealson, A. L. Osterman, G. Pinchuk, J. L. Reed, D. A. Rodionov, J. L. M. Rodrigues, D. A. Saffarini, M. H. Serres, A. M. Spormann, I. B. Zhulin, and J. M. Tiedje.** 2008. Towards environmental systems biology of *Shewanella*. *Nature Reviews Microbiology* **6**:592-603.
64. **Fredrickson, J. K., J. M. Zachara, D. W. Kennedy, H. L. Dong, T. C. Onstott, N. W. Hinman, and S. M. Li.** 1998. Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction of hydrous ferric oxide by a groundwater bacterium. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **62**:3239-3257.
65. **Fronzes, R., H. Remaut, and G. Waksman.** 2008. Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *EMBO J* **27**:2271-80.

66. **Gao, H., A. Obrztova, N. Stewart, R. Popa, J. K. Fredrickson, J. M. Tiedje, K. H. Nealson, and J. Zhou.** 2006. *Shewanella loihica* sp. nov., isolated from iron-rich microbial mats in the Pacific Ocean. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**:1911-6.
67. **Gao, H., X. Wang, Z. K. Yang, T. Palzkill, and J. Zhou.** 2008. Probing regulon of ArcA in *Shewanella oneidensis* MR-1 by integrated genomic analyses. *BMC Genomics* **9**:42.
68. **Georgellis, D., O. Kwon, P. De Wulf, and E. C. C. Lin.** 1998. Signal decay through a reverse phosphorelay in the arc two-component signal transduction system. *Journal of Biological Chemistry* **273**:32864-32869.
69. **Georgellis, D., O. Kwon, E. C. Lin, S. M. Wong, and B. J. Akerley.** 2001. Redox signal transduction by the ArcB sensor kinase of *Haemophilus influenzae* lacking the PAS domain. *J Bacteriol* **183**:7206-12.
70. **Georgellis, D., O. Kwon, and E. C. C. Lin.** 2001. Quinones as the redox signal for the Arc two-component system of bacteria. *Science* **292**:2314-2316.
71. **Georgellis, D., A. S. Lynch, and E. C. Lin.** 1997. In vitro phosphorylation study of the arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**:5429-35.
72. **Gescher, J. S., C. D. Cordova, and A. M. Spormann.** 2008. Dissimilatory iron reduction in *Escherichia coli*: identification of CymA of *Shewanella oneidensis* and NapC of *E. coli* as ferric reductases. *Molecular Microbiology* **68**:706-719.
73. **Gödeke, J., K. Paul, J. Lassak, and K. M. Thormann.** 2010. Phage-induced lysis enhances biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *The ISME Journal*.
74. **Gottesman, S., P. Trisler, and A. Torrescabassa.** 1985. Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12 - Characterization of 3 regulatory genes. *Journal of Bacteriology* **162**:1111-1119.
75. **Gralnick, J. A., C. T. Brown, and D. K. Newman.** 2005. Anaerobic regulation by an atypical Arc system in *Shewanella oneidensis*. *Mol Microbiol* **56**:1347-57.
76. **Gralnick, J. A., H. Vali, D. P. Lies, and D. K. Newman.** 2006. Extracellular respiration of dimethyl sulfoxide by *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:4669-4674.
77. **Guest, J. R., and D. J. Shaw.** 1981. Molecular cloning of menaquinone biosynthetic genes of *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* **181**:379-83.
78. **Guzman, L. M., D. Belin, M. J. Carson, and J. Beckwith.** 1995. Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose P-Bad Promoter. *Journal of Bacteriology* **177**:4121-4130.
79. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**:557-580.
80. **Hau, H. H., and J. A. Gralnick.** 2007. Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annu Rev Microbiol* **61**:237-58.
81. **Heidelberg, J. F., I. T. Paulsen, K. E. Nelson, E. J. Gaidos, W. C. Nelson, T. D. Read, J. A. Eisen, R. Seshadri, N. Ward, B. Methe, R. A. Clayton, T. Meyer, A. Tsapin, J. Scott, M. Beanan, L. Brinkac, S. Daugherty, R. T. DeBoy, R. J. Dodson, A. S. Durkin, D. H. Haft, J. F. Kolonay, R. Madupu, J. D. Peterson, L. A. Umayam, O. White, A. M. Wolf, J. Vamathevan, J. Weidman, M. Impraim, K. Lee, K. Berry, C. Lee, J. Mueller, H. Khouri, J. Gill, T. R. Utterback, L. A. McDonald, T. V. Feldblyum, H. O. Smith, J. C. Venter, K. H. Nealson, and C. M. Fraser.** 2002. Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nature Biotechnology* **20**:1118-1123.
82. **Henche, A. L.** 2009. Untersuchung des Proteins SO_0577 als potenzielle Sensorkinase des Arc-Systems in *Shewanella oneidensis* MR-1.
83. **Hengge, R.** 2009. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**:263-73.
84. **Hershberg, R., and H. Margalit.** 2006. Co-evolution of transcription factors and their targets depends on mode of regulation. *Genome Biol* **7**:R62.
85. **Hess, J. F., K. Oosawa, N. Kaplan, and M. I. Simon.** 1988. Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis. *Cell* **53**:79-87.
86. **Hochberg, Y.** 1988. A sharper Bonferroni procedure for multiple tests of significance. *Biometrika* **75**:800-802.
87. **Hsing, W., and T. J. Silhavy.** 1997. Function of conserved histidine-243 in phosphatase activity of EnvZ, the sensor for porin osmoregulation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**:3729-35.
88. **Hurley, J. H., A. M. Dean, J. L. Sohl, D. E. Koshland, Jr., and R. M. Stroud.** 1990. Regulation of an enzyme by phosphorylation at the active site. *Science* **249**:1012-6.
89. **Igo, M. M., A. J. Ninfa, and T. J. Silhavy.** 1989. A bacterial environmental sensor that functions as a protein kinase and stimulates transcriptional activation. *Genes Dev* **3**:598-605.

90. **Igo, M. M., A. J. Ninfa, J. B. Stock, and T. J. Silhavy.** 1989. Phosphorylation and Dephosphorylation of a Bacterial Transcriptional Activator by a Transmembrane Receptor. *Genes & Development* **3**:1725-1734.
91. **Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:23-8.
92. **Ishige, K., S. Nagasawa, S. Tokishita, and T. Mizuno.** 1994. A novel device of bacterial signal transducers. *EMBO J* **13**:5195-202.
93. **Ishikawa, S., L. Core, and M. Perego.** 2002. Biochemical characterization of aspartyl phosphate phosphatase interaction with a phosphorylated response regulator and its inhibition by a pentapeptide. *J Biol Chem* **277**:20483-9.
94. **Iuchi, S.** 1993. Phosphorylation Dephosphorylation of the Receiver Module at the Conserved Aspartate Residue Controls Transphosphorylation Activity of Histidine Kinase in Sensor Protein ArcB of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **268**:23972-23980.
95. **Iuchi, S., D. C. Cameron, and E. C. C. Lin.** 1989. A second global regulator gene (*arcB*) mediating repression of enzymes in aerobic pathways of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **171**:868-873.
96. **Iuchi, S., D. Furlong, and E. C. C. Lin.** 1989. Differentiation of *arcA*, *arcB*, and *cpxA* Mutant Phenotypes of *Escherichia coli* by Sex Pilus Formation and Enzyme Regulation. *Journal of Bacteriology* **171**:2889-2893.
97. **Iuchi, S., and E. C. Lin.** 1992. Mutational analysis of signal transduction by ArcB, a membrane sensor protein responsible for anaerobic repression of operons involved in the central aerobic pathways in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**:3972-80.
98. **Iuchi, S., and E. C. C. Lin.** 1988. *arcA* (*dye*), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**:1888-1892.
99. **Iuchi, S., Z. Matsuda, T. Fujiwara, and E. C. Lin.** 1990. The *arcB* gene of *Escherichia coli* encodes a sensor-regulator protein for anaerobic repression of the *arc* modulon. *Mol Microbiol* **4**:715-27.
100. **Jagadeesan, S., P. Mann, C. W. Schink, and P. I. Higgs.** 2009. A novel "four-component" two-component signal transduction mechanism regulates developmental progression in *Myxococcus xanthus*. *J Biol Chem* **284**:21435-45.
101. **Janiak-Spens, F., J. M. Sparling, M. Gurfinkel, and A. H. West.** 1999. Differential stabilities of phosphorylated response regulator domains reflect functional roles of the yeast osmoregulatory SLN1 and SSK1 proteins. *J Bacteriol* **181**:411-7.
102. **Jenal, U., and J. Malone.** 2006. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annual Review of Genetics* **40**:385-407.
103. **Jencks, W. P.** 1980. The utilization of binding energy in coupled vectorial processes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **51**:75-106.
104. **Jeon, Y., Y. S. Lee, J. S. Han, J. B. Kim, and D. S. Hwang.** 2001. Multimerization of phosphorylated and non-phosphorylated ArcA is necessary for the response regulator function of the Arc two-component signal transduction system. *J Biol Chem* **276**:40873-9.
105. **Jeong, J. Y., Y. J. Kim, N. W. Cho, D. W. Shin, T. W. Nam, S. Ryu, and Y. J. Seok.** 2004. Expression of ptsG encoding the major glucose transporter is regulated by ArcA in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **279**:38513-38518.
106. **Johnson, L. N., and M. O'Reilly.** 1996. Control by phosphorylation. *Curr Opin Struct Biol* **6**:762-9.
107. **K. Neilson , and J. Scott.** 2005. *Ecophysiology of the genus Shewanella*. Springer-Verlag.
108. **Karimova, G., J. Pidoux, A. Ullmann, and D. Ladant.** 1998. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:5752-6.
109. **Kato, A., A. Y. Mitrophanov, and E. A. Groisman.** 2007. A connector of two-component regulatory systems promotes signal amplification and persistence of expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**:12063-12068.
110. **Kiley, P. J., and H. Beinert.** 1998. Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. *Fems Microbiology Reviews* **22**:341-352.
111. **Klipper-Aurbach, Y., M. Wasserman, N. Braunsiegel-Weintrob, D. Borstein, S. Peleg, S. Assa, M. Karp, Y. Benjamini, Y. Hochberg, and Z. Laron.** 1995. Mathematical formulae for the prediction of the residual beta cell function during the first two years of disease in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *Med Hypotheses* **45**:486-90.
112. **Klonowska, A., T. Heulin, and A. Vermeglio.** 2005. Selenite and tellurite reduction by *Shewanella oneidensis*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:5607-5609.

113. **Koretke, K. K., A. N. Lupas, P. V. Warren, M. Rosenberg, and J. R. Brown.** 2000. Evolution of two-component signal transduction. *Mol Biol Evol* **17**:1956-70.
114. **Koshland, D. E.** 1952. Effect of Catalysts on the Hydrolysis of Acetyl Phosphate - Nucleophilic Displacement Mechanisms in Enzymatic Reactions. *Journal of the American Chemical Society* **74**:2286-2292.
115. **Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, 2nd, and K. M. Peterson.** 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**:175-6.
116. **Kulakova, L., A. Galkin, T. Kurihara, T. Yoshimura, and N. Esaki.** 1999. Cold-active serine alkaline protease from the psychrotrophic bacterium *Shewanella strain* Ac10: gene cloning and enzyme purification and characterization. *Appl Environ Microbiol* **65**:611-7.
117. **Kwon, O., D. Georgellis, and E. C. Lin.** 2000. Phosphorelay as the sole physiological route of signal transmission by the arc two-component system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**:3858-62.
118. **Kwon, O., D. Georgellis, and E. C. Lin.** 2003. Rotational on-off switching of a hybrid membrane sensor kinase Tar-ArcB in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**:13192-5.
119. **Kwon, O., D. Georgellis, A. S. Lynch, D. Boyd, and E. C. Lin.** 2000. The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli*: genetic exploration of the transmembrane region. *J Bacteriol* **182**:2960-6.
120. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
121. **Lambden, P. R., and J. R. Guest.** 1976. Mutants of *Escherichia coli* K12 Unable to Use Fumarate as an Anaerobic Electron-Acceptor. *Journal of General Microbiology* **97**:145-160.
122. **Lambertsen, L., C. Sternberg, and S. Molin.** 2004. Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins. *Environ Microbiol* **6**:726-32.
123. **Lassak, J., A. L. Henche, L. Binnenkade, and K. M. Thormann.** 2010. ArcS, the cognate sensor kinase in an atypical Arc system of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol* **76**:3263-74.
124. **Lau, P. C., Y. Wang, A. Patel, D. Labbe, H. Bergeron, R. Brousseau, Y. Konishi, and M. Rawlings.** 1997. A bacterial basic region leucine zipper histidine kinase regulating toluene degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:1453-8.
125. **Laub, M. T., and M. Goulian.** 2007. Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annual Review of Genetics* **41**:121-145.
126. **Leonardo, M. R., D. P. Moser, E. Barbieri, C. A. Brantner, B. J. MacGregor, B. J. Paster, E. Stackebrandt, and K. H. Nealson.** 1999. *Shewanella pealeana* sp. nov., a member of the microbial community associated with the accessory nidamental gland of the squid *Loligo pealei*. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 4**:1341-51.
127. **Letunic, I., and P. Bork.** 2007. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* **23**:127-8.
128. **Lippa, A. M., and M. Goulian.** 2009. Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide. *PLoS Genet* **5**:e1000788.
129. **Liu, X., and P. De Wulf.** 2004. Probing the ArcA-P modulon of *Escherichia coli* by whole genome transcriptional analysis and sequence recognition profiling. *J Biol Chem* **279**:12588-97.
130. **Liu, X., G. R. Pena Sandoval, B. L. Wanner, W. S. Jung, D. Georgellis, and O. Kwon.** 2009. Evidence against the physiological role of acetyl phosphate in the phosphorylation of the ArcA response regulator in *Escherichia coli*. *J Microbiol* **47**:657-62.
131. **Liu, Y., W. Gao, Y. Wang, L. Wu, X. Liu, T. Yan, E. Alm, A. Arkin, D. K. Thompson, M. W. Fields, and J. Zhou.** 2005. Transcriptome analysis of *Shewanella oneidensis* MR-1 in response to elevated salt conditions. *J Bacteriol* **187**:2501-7.
132. **Lloyd, J. R., P. Yong, and L. E. Macaskie.** 2000. Biological reduction and removal of Np(V) by two microorganisms. *Environmental Science & Technology* **34**:1297-1301.
133. **Long, H., and B. Hammer.** 1941. Classification of organisms important in dairy products. III. *Pseudomonas putrefaciens*. *IOWA Agricultural Experiment Station Research Bulletin* **285**:176-195.
134. **Lozada-Chavez, I., S. C. Janga, and J. Collado-Vides.** 2006. Bacterial regulatory networks are extremely flexible in evolution. *Nucleic Acids Research* **34**:3434-3445.
135. **Lu, S., P. B. Killoran, F. C. Fang, and L. W. Riley.** 2002. The global regulator ArcA controls resistance to reactive nitrogen and oxygen intermediates in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Infect Immun* **70**:451-61.

136. **Lukat, G. S., W. R. McCleary, A. M. Stock, and J. B. Stock.** 1992. Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:718-22.
137. **Lynch, A. S., and E. C. Lin.** 1996. Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli*: characterization of DNA binding at target promoters. *J Bacteriol* **178**:6238-49.
138. **MacDonell, M. T., and R. R. Colwell.** 1985. Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and Recommendation for 2 New Genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Systematic and Applied Microbiology* **6**:171-182.
139. **Maier, T. M., and C. R. Myers.** 2001. Isolation and characterization of a *Shewanella putrefaciens* MR-1 electron transport regulator *etrA* mutant: Reassessment of the role of EtrA. *Journal of Bacteriology* **183**:4918-4926.
140. **Makemson, J. C., N. R. Fulayfil, W. Landry, L. M. Van Ert, C. F. Wimpee, E. A. Widder, and J. F. Case.** 1997. *Shewanella woodyi* sp. nov., an exclusively respiratory luminous bacterium isolated from the Alboran Sea. *Int J Syst Bacteriol* **47**:1034-9.
141. **Makino, K., H. Shinagawa, M. Amemura, T. Kawamoto, M. Yamada, and A. Nakata.** 1989. Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *J Mol Biol* **210**:551-9.
142. **Malpica, R., B. Franco, C. Rodriguez, O. Kwon, and D. Georgellis.** 2004. Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:13318-23.
143. **Malpica, R., G. R. Sandoval, C. Rodriguez, B. Franco, and D. Georgellis.** 2006. Signaling by the arc two-component system provides a link between the redox state of the quinone pool and gene expression. *Antioxid Redox Signal* **8**:781-95.
144. **Manukhov, I. V., Y. V. Bertsova, D. Y. Trofimov, A. V. Bogachev, and V. P. Skulachev.** 2000. Analysis of HI0220 protein from *Haemophilus influenzae*, a novel structural and functional analog of ArcB protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry (Mosc)* **65**:1321-6.
145. **Marlinghaus, L.** 2007. Einfluss von Zwei-Komponentensystemen auf die Initiierung der Biofilmbildung von *Shewanella oneidensis* MR-1
146. **Matsushika, A., and T. Mizuno.** 2000. Characterization of three putative sub-domains in the signal-input domain of the ArcB hybrid sensor in *Escherichia coli*. *J Biochem* **127**:855-60.
147. **McCleary, W. R., and J. B. Stock.** 1994. Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J Biol Chem* **269**:31567-72.
148. **McCleary, W. R., J. B. Stock, and A. J. Ninfa.** 1993. Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*? *J Bacteriol* **175**:2793-8.
149. **Meyer, T. E., A. I. Tsapin, I. Vandenbergh, L. De Smet, D. Frishman, K. H. Neilson, M. A. Cusanovich, and J. J. Van Beeumen.** 2004. Identification of 42 possible cytochrome c genes in the *Shewanella oneidensis* genome and characterization of six soluble cytochromes. *Omics-a Journal of Integrative Biology* **8**:57-77.
150. **Mika, F., and R. Hengge.** 2005. A two-component phosphotransfer network involving ArcB, ArcA, and RssB coordinates synthesis and proteolysis of sigmaS (RpoS) in *E. coli*. *Genes Dev* **19**:2770-81.
151. **Miller, V. L., and J. J. Mekalanos.** 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. *J Bacteriol* **170**:2575-83.
152. **Moses, A. M., D. A. Pollard, D. A. Nix, V. N. Iyer, X. Y. Li, M. D. Biggin, and M. B. Eisen.** 2006. Large-scale turnover of functional transcription factor binding sites in *Drosophila*. *PLoS Comput Biol* **2**:e130.
153. **Murray, A. E., D. Lies, G. Li, K. Neilson, J. Zhou, and J. M. Tiedje.** 2001. DNA/DNA hybridization to microarrays reveals gene-specific differences between closely related microbial genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:9853-9858.
154. **Myers, C. R., and J. M. Myers.** 1997. Cloning and sequence of *cymA* a gene encoding a tetraheme cytochrome c required for reduction of iron(III), fumarate, and nitrate by *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Journal of Bacteriology* **179**:1143-1152.
155. **Myers, C. R., and J. M. Myers.** 1992. Fumarate Reductase Is a Soluble Enzyme in Anaerobically Grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Fems Microbiology Letters* **98**:13-19.
156. **Myers, C. R., and J. M. Myers.** 1997. Isolation and characterization of a transposon mutant of *Shewanella putrefaciens* MR-1 deficient in fumarate reductase. *Letters in Applied Microbiology* **25**:162-168.

157. **Myers, C. R., and J. M. Myers.** 1997. Replication of plasmids with the p15A origin in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Lett Appl Microbiol* **24**:221-5.
158. **Myers, C. R., and K. H. Nealson.** 1988. Bacterial Manganese Reduction and Growth with Manganese Oxide as the Sole Electron-Acceptor. *Science* **240**:1319-1321.
159. **Myers, J. M., and C. R. Myers.** 2001. Role for outer membrane cytochromes OmcA and OmcB of *Shewanella putrefaciens* MR-1 in reduction of manganese dioxide. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:260-269.
160. **Myers, J. M., and C. R. Myers.** 2000. Role of the tetraheme cytochrome CymA in anaerobic electron transport in cells of *Shewanella putrefaciens* MR-1 with normal levels of menaquinone. *Journal of Bacteriology* **182**:67-75.
161. **Nambu, J. R., J. O. Lewis, K. A. Wharton, Jr., and S. T. Crews.** 1991. The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* **67**:1157-67.
162. **Nealson, K. H., D. Moser, and D. Saffarini.** 1995. Anaerobic Electron-Acceptor Chemotaxis in *Shewanella putrefaciens*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**:1551-1554.
163. **Nealson, K. H., C. R. Myers, and B. B. Wimpsee.** 1991. Isolation and identification of manganese-reducing bacteria and estimates of microbial Mn(IV)-reducing potential in the Black-Sea. *Deep-Sea Research Part a-Oceanographic Research Papers* **38**:S907-S920.
164. **Nixon, B. T., C. W. Ronson, and F. M. Ausubel.** 1986. 2-Component Regulatory Systems Responsive to Environmental Stimuli Share Strongly Conserved Domains with the Nitrogen Assimilation Regulatory Genes *ntrB* and *ntrC*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**:7850-7854.
165. **Nogi, Y., C. Kato, and K. Horikoshi.** 1998. Taxonomic studies of deep-sea barophilic *Shewanella* strains and description of *Shewanella violacea* sp. nov. *Arch Microbiol* **170**:331-8.
166. **Obuekwe, C. O., and D. W. Westlake.** 1982. Effects of medium composition on cell pigmentation, cytochrome content, and ferric iron reduction in a *Pseudomonas* sp. isolated from crude oil. *Can J Microbiol* **28**:989-92.
167. **Ochman, H., J. G. Lawrence, and E. A. Groisman.** 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**:299-304.
168. **Odom, D. T., R. D. Dowell, E. S. Jacobsen, W. Gordon, T. W. Danford, K. D. MacIsaac, P. A. Rolfe, C. M. Conboy, D. K. Gifford, and E. Fraenkel.** 2007. Tissue-specific transcriptional regulation has diverged significantly between human and mouse. *Nature Genetics* **39**:730-732.
169. **Ogasawara, H., J. Teramoto, S. Yamamoto, K. Hirao, K. Yamamoto, A. Ishihama, and R. Utsumi.** 2005. Negative regulation of DNA repair gene (*uvrA*) expression by ArcA/ArcB two-component system in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **251**:243-9.
170. **Ogino, T., M. Matsubara, N. Kato, Y. Nakamura, and T. Mizuno.** 1998. An *Escherichia coli* protein that exhibits phosphohistidine phosphatase activity towards the HPt domain of the ArcB sensor involved in the multistep His-Asp phosphorelay. *Mol Microbiol* **27**:573-85.
171. **Pallen, M. J., and B. W. Wren.** 2007. Bacterial pathogenomics. *Nature* **449**:835-42.
172. **Parks, A. R., and J. E. Peters.** 2007. Transposon Tn7 is widespread in diverse bacteria and forms genomic islands. *Journal of Bacteriology* **189**:2170-2173.
173. **Paul, R., S. Weiser, N. C. Amiot, C. Chan, T. Schirmer, B. Giese, and U. Jenal.** 2004. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes & Development* **18**:715-727.
174. **Paulick, A., A. Koerdt, J. Lassak, S. Huntley, I. Wilms, F. Narberhaus, and K. M. Thormann.** 2009. Two different stator systems drive a single polar flagellum in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Mol Microbiol* **71**:836-50.
175. **Pena-Sandoval, G. R., O. Kwon, and D. Georgellis.** 2005. Requirement of the receiver and phosphotransfer domains of ArcB for efficient dephosphorylation of phosphorylated ArcA *in vivo*. *J Bacteriol* **187**:3267-72.
176. **Perego, M.** 2001. A new family of aspartyl phosphate phosphatases targeting the sporulation transcription factor Spo0A of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **42**:133-43.
177. **Perez, J. C., and E. A. Groisman.** 2009. Evolution of transcriptional regulatory circuits in bacteria. *Cell* **138**:233-44.
178. **Perez, J. C., D. Shin, I. Zwir, T. Latifi, T. J. Hadley, and E. A. Groisman.** 2009. Evolution of a bacterial regulon controlling virulence and Mg(2+) homeostasis. *PLoS Genet* **5**:e1000428.
179. **Pernestig, A. K., O. Melefors, and D. Georgellis.** 2001. Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**:225-31.
180. **Pickart, C. M., and W. P. Jencks.** 1984. Energetics of the Calcium-Transporting Atpase. *Journal of Biological Chemistry* **259**:1629-1643.

181. **Piggot, P. J., and D. W. Hilbert.** 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol* **7**:579-86.
182. **Pinchuk, G. E., D. A. Rodionov, C. Yang, X. Q. Li, A. L. Osterman, E. Dervyn, O. V. Geydebrekht, S. B. Reed, M. F. Romine, F. R. Collart, J. H. Scott, J. K. Fredrickson, and A. S. Beliaev.** 2009. Genomic reconstruction of *Shewanella oneidensis* MR-1 metabolism reveals a previously uncharacterized machinery for lactate utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:2874-2879.
183. **Ponting, C. P., and L. Aravind.** 1997. PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Curr Biol* **7**:R674-7.
184. **Pospiech, A., and B. Neumann.** 1995. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends Genet* **11**:217-8.
185. **Price, M. N., P. S. Dehal, and A. P. Arkin.** 2008. Horizontal gene transfer and the evolution of transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Genome Biol* **9**:R4.
186. **Price, M. N., P. S. Dehal, and A. P. Arkin.** 2007. Orthologous transcription factors in bacteria have different functions and regulate different genes. *Plos Computational Biology* **3**:1739-1750.
187. **Rabin, R. S., L. A. Collins, and V. Stewart.** 1992. In vivo requirement of integration host factor for nar (nitrate reductase) operon expression in *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:8701-5.
188. **Rajewsky, N., N. D. Socci, M. Zapotocky, and E. D. Siggia.** 2002. The evolution of DNA regulatory regions for proteo-gamma bacteria by interspecies comparisons. *Genome Res* **12**:298-308.
189. **Ramirez-Romero, M. A., P. Bustos, L. Girard, O. Rodriguez, M. A. Cevallos, and G. Davila.** 1997. Sequence, localization and characteristics of the replicator region of the symbiotic plasmid of *Rhizobium elii*. *Microbiology* **143** (Pt 8):2825-31.
190. **Rasmussen, A. A., S. Wegener-Feldbrugge, S. L. Porter, J. P. Armitage, and L. Sogaard-Andersen.** 2006. Four signalling domains in the hybrid histidine protein kinase RodK of *Myxococcus xanthus* are required for activity. *Mol Microbiol* **60**:525-34.
191. **Rhodium, V. A., W. C. Suh, G. Nonaka, J. West, and C. A. Gross.** 2006. Conserved and variable functions of the sigma(E) stress response in related genomes. *Plos Biology* **4**:43-59.
192. **Rodionov, D. A.** 2007. Comparative genomic reconstruction of transcriptional regulatory networks in bacteria. *Chemical Reviews* **107**:3467-3497.
193. **Roggiani, M., and D. Dubnau.** 1993. ComA, a phosphorylated response regulator protein of *Bacillus subtilis*, binds to the promoter region of *srfA*. *J Bacteriol* **175**:3182-7.
194. **Romling, U., and D. Amikam.** 2006. Cyclic di-GMP as a second messenger. *Current Opinion in Microbiology* **9**:218-228.
195. **Ryan, R. P., Y. Fouhy, J. F. Lucey, L. C. Crossman, S. Spiro, Y. W. He, L. H. Zhang, S. Heeb, M. Camara, P. Williams, and J. M. Dow.** 2006. Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:6712-6717.
196. **Saffarini, D. A., R. Schultz, and A. Beliaev.** 2003. Involvement of cyclic AMP (cAMP) and cAMP receptor protein in anaerobic respiration of *Shewanella oneidensis*. *Journal of Bacteriology* **185**:3668-3671.
197. **Salmon, K., S. P. Hung, K. Mekjian, P. Baldi, G. W. Hatfield, and R. P. Gunsalus.** 2003. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12 - The effects of oxygen availability and FNR. *Journal of Biological Chemistry* **278**:29837-29855.
198. **Salmon, K. A., S. Hung, N. R. Steffen, R. Krupp, P. Baldi, G. W. Hatfield, and R. P. Gunsalus.** 2005. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12 - Effects of oxygen availability and ArcA. *Journal of Biological Chemistry* **280**:15084-15096.
199. **Saltikov, C. W., A. Cifuentes, K. Venkateswaran, and D. K. Newman.** 2003. The ars detoxification system is advantageous but not required for As(V) respiration by the genetically tractable *Shewanella species* strain ANA-3. *Appl Environ Microbiol* **69**:2800-9.
200. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
201. **Sawers, G., and B. Suppmann.** 1992. Anaerobic Induction of Pyruvate Formate-Lyase Gene-Expression Is Mediated by the ArcA and Fnr Proteins. *Journal of Bacteriology* **174**:3474-3478.
202. **Schmidt, A. J., D. A. Ryjenkov, and M. Gomelsky.** 2005. The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: Enzymatically active and inactive EAL domains. *Journal of Bacteriology* **187**:4774-4781.

203. **Sengupta, N., K. Paul, and R. Chowdhury.** 2003. The global regulator ArcA modulates expression of virulence factors in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **71**:5583-9.
204. **Serres, M. H., and M. Riley.** 2006. Genomic analysis of carbon source metabolism of *Shewanella oneidensis* MR-1: Predictions versus experiments. *Journal of Bacteriology* **188**:4601-4609.
205. **Shi, X. Q., S. Wegener-Feldbrugge, S. Huntley, N. Hamann, R. Hedderich, and L. Sogaard-Andersen.** 2008. Bioinformatics and experimental analysis of proteins of two-component systems in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology* **190**:613-624.
206. **Shroff, N. P., M. A. Charania, and D. A. Saffarini.** 2010. ArcB1, a homolog of *Escherichia coli* ArcB, regulates dimethyl sulfoxide reduction in *Shewanella oneidensis* MR-1. *J Bacteriol* **192**:3227-30.
207. **Silverman, P. M., S. Rother, and H. Gaudin.** 1991. Arc and Sfr functions of the *Escherichia coli* K-12 *arcA* gene-product are genetically and physiologically separable. *Journal of Bacteriology* **173**:5648-5652.
208. **Silverman, P. M., E. Wickersham, and R. Harris.** 1991. Regulation of the F-Plasmid Tray promoter in *Escherichia coli* by host and plasmid factors. *Journal of Molecular Biology* **218**:119-128.
209. **Skerker, J. M., B. S. Perchuk, A. Siryaporn, E. A. Lubin, O. Ashenberg, M. Goulian, and M. T. Laub.** 2008. Rewiring the specificity of two-component signal transduction systems. *Cell* **133**:1043-1054.
210. **Smith, T. F., and M. S. Waterman.** 1981. Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol* **147**:195-7.
211. **Stewart, V.** 2003. Nitrate- and nitrite-responsive sensors NarX and NarQ of proteobacteria. *Biochemical Society Transactions* **31**:1-10.
212. **Stewart, V., J. Parales, and S. M. Merkel.** 1989. Structure of Genes Narl and Narx of the Nar (Nitrate Reductase) Locus in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **171**:2229-2234.
213. **Stock, A. M., V. L. Robinson, and P. N. Goudreau.** 2000. Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry* **69**:183-215.
214. **Stock, J. B., A. M. Stock, and J. M. Mottonen.** 1990. Signal Transduction in Bacteria. *Nature* **344**:395-400.
215. **Stock, J. B., M. G. Surette, M. Levit, and P. Park.** 1995. Two component Signal Transduction Systems: Structure-Function Relationships and Mechanisms of Catalysis. . ASM press, Washington D.C.
216. **Tamayo, R., J. T. Pratt, and A. Camilli.** 2007. Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* **61**:131-48.
217. **Tanford, C.** 1984. Twenty questions concerning the reaction cycle of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *CRC Crit Rev Biochem* **17**:123-51.
218. **Taylor, B. L., and I. B. Zhulin.** 1999. PAS domains: Internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**:479-+.
219. **Theunissen, S., L. De Smet, A. Dansercoer, B. Motte, T. Coenye, J. J. Van Beeumen, B. Devreese, S. N. Savvides, and B. Vergauwen.** 2010. The 285 kDa Bap/RTX hybrid cell surface protein (SO4317) of *Shewanella oneidensis* MR-1 is a key mediator of biofilm formation. *Research in Microbiology* **161**:144-152.
220. **Theunissen, S., B. Vergauwen, L. De Smet, J. Van Beeumen, P. Van Gelder, and S. N. Savvides.** 2009. The agglutination protein AggA from *Shewanella oneidensis* MR-1 is a TolC-like protein and forms active channels in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **386**:380-5.
221. **Thormann, K. M., S. Duttler, R. M. Saville, M. Hyodo, S. Shukla, Y. Hayakawa, and A. M. Spormann.** 2006. Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic di-GMP. *J Bacteriol* **188**:2681-91.
222. **Thormann, K. M., R. M. Saville, S. Shukla, D. A. Pelletier, and A. M. Spormann.** 2004. Initial Phases of biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *J Bacteriol* **186**:8096-104.
223. **Thormann, K. M., R. M. Saville, S. Shukla, and A. M. Spormann.** 2005. Induction of rapid detachment in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. *J Bacteriol* **187**:1014-21.
224. **Tuch, B. B., D. J. Galgoczy, A. D. Hernday, H. Li, and A. D. Johnson.** 2008. The evolution of combinatorial gene regulation in fungi. *PLoS Biol* **6**:e38.
225. **Ulrich, L. E., E. V. Koonin, and I. B. Zhulin.** 2005. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol* **13**:52-6.
226. **Unden, G.** 1988. Differential roles for menaquinone and demethylmenaquinone in anaerobic electron transport of *E. coli* and their *fnr*-independent expression. *Arch Microbiol* **150**:499-503.

227. Venkateswaran, K., M. E. Dollhopf, R. Aller, E. Stackebrandt, and K. H. Nealson. 1998. *Shewanella amazonensis* sp. nov., a novel metal-reducing facultative anaerobe from Amazonian shelf muds. *Int J Syst Bacteriol* **48** Pt 3:965-72.
228. Venkateswaran, K., D. P. Moser, M. E. Dollhopf, D. P. Lies, D. A. Saffarini, B. J. MacGregor, D. B. Ringelberg, D. C. White, M. Nishijima, H. Sano, J. Burghardt, E. Stackebrandt, and K. H. Nealson. 1999. Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49** Pt 2:705-24.
229. Venkateswaran, K., D. P. Moser, M. E. Dollhopf, D. P. Lies, D. A. Saffarini, B. J. MacGregor, D. B. Ringelberg, D. C. White, M. Nishijima, H. Sano, J. Burghardt, E. Stackebrandt, and K. H. Nealson. 1999. Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**:705-724.
230. Venter, J. C., K. Remington, J. F. Heidelberg, A. L. Halpern, D. Rusch, J. A. Eisen, D. Wu, I. Paulsen, K. E. Nelson, W. Nelson, D. E. Fouts, S. Levy, A. H. Knap, M. W. Lomas, K. Nealson, O. White, J. Peterson, J. Hoffman, R. Parsons, H. Baden-Tillson, C. Pfannkoch, Y. H. Rogers, and H. O. Smith. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**:66-74.
231. Virlogeux, I., H. Waxin, C. Ecobichon, J. O. Lee, and M. Y. Popoff. 1996. Characterization of the *rcaA* and *rcaB* genes from *Salmonella typhi*: *rcaB* through *tviA* is involved in regulation of Vi antigen synthesis. *J Bacteriol* **178**:1691-8.
232. Wang, F., P. Wang, M. Chen, and X. Xiao. 2004. Isolation of extremophiles with the detection and retrieval of *Shewanella* strains in deep-sea sediments from the west Pacific. *Extremophiles* **8**:165-8.
233. Waterston, R. H., K. Lindblad-Toh, E. Birney, J. Rogers, J. F. Abril, P. Agarwal, R. Agarwala, R. Ainscough, M. Alexandersson, P. An, S. E. Antonarakis, J. Attwood, R. Baertsch, J. Bailey, K. Barlow, S. Beck, E. Berry, B. Birren, T. Bloom, P. Bork, M. Botcherby, N. Bray, M. R. Brent, D. G. Brown, S. D. Brown, C. Bult, J. Burton, J. Butler, R. D. Campbell, P. Carninci, S. Cawley, F. Chiaromonte, A. T. Chinwalla, D. M. Church, M. Clamp, C. Clee, F. S. Collins, L. L. Cook, R. R. Copley, A. Coulson, O. Couronne, J. Cuff, V. Curwen, T. Cutts, M. Daly, R. David, J. Davies, K. D. Delehaunty, J. Deri, E. T. Dermitzakis, C. Dewey, N. J. Dickens, M. Diekhans, S. Dodge, I. Dubchak, D. M. Dunn, S. R. Eddy, L. Elnitski, R. D. Emes, P. Eswara, E. Eyra, A. Felsenfeld, G. A. Fewell, P. Flicek, K. Foley, W. N. Frankel, L. A. Fulton, R. S. Fulton, T. S. Furey, D. Gage, R. A. Gibbs, G. Glusman, S. Gnerre, N. Goldman, L. Goodstadt, D. Grafham, T. A. Graves, E. D. Green, S. Gregory, R. Guigo, M. Guyer, R. C. Hardison, D. Haussler, Y. Hayashizaki, L. W. Hillier, A. Hinrichs, W. Hlavina, T. Holzer, F. Hsu, A. Hua, T. Hubbard, A. Hunt, I. Jackson, D. B. Jaffe, L. S. Johnson, M. Jones, T. A. Jones, A. Joy, M. Kamal, E. K. Karlsson, et al. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**:520-62.
234. Weiss, V., and B. Magasanik. 1988. Phosphorylation of nitrogen regulator I (NRI) of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:8919-23.
235. Welch, R. A., V. Burland, G. Plunkett, 3rd, P. Redford, P. Roesch, D. Rasko, E. L. Buckles, S. R. Liou, A. Boutin, J. Hackett, D. Stroud, G. F. Mayhew, D. J. Rose, S. Zhou, D. C. Schwartz, N. T. Perna, H. L. Mobley, M. S. Donnenberg, and F. R. Blattner. 2002. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:17020-4.
236. Wieling, B., M. M. Mizuba, C. M. Hansel, and S. Fendorf. 2001. Iron promoted reduction of chromate by dissimilatory iron-reducing bacteria. *Environmental Science & Technology* **35**:522-527.
237. Wildung, R. E., Y. A. Gorby, K. M. Krupka, N. J. Hess, S. W. Li, A. E. Plymale, J. P. McKinley, and J. K. Fredrickson. 2000. Effect of electron donor and solution chemistry on products of dissimilatory reduction of technetium by *Shewanella putrefaciens*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:2451-2460.
238. Winfield, M. D., T. Latifi, and E. A. Groisman. 2005. Transcriptional regulation of the 4-amino-4-deoxy-L-arabinose biosynthetic genes in *Yersinia pestis*. *Journal of Biological Chemistry* **280**:14765-14772.
239. Woese, C. R. 2002. On the evolution of cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:8742-7.
240. Wolfe, A. J., and K. L. Visick. 2008. Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *J Bacteriol* **190**:463-75.

241. **Wright, G. D., T. R. Holman, and C. T. Walsh.** 1993. Purification and characterization of VanR and the cytosolic domain of VanS: a two-component regulatory system required for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147. *Biochemistry* **32**:5057-63.
242. **Wuichet, K., B. J. Cantwell, and I. B. Zhulin.** 2010. Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems. *Curr Opin Microbiol* **13**:219-25.
243. **Wuichet, K., and I. B. Zhulin.** 2003. Molecular evolution of sensory domains in cyanobacterial chemoreceptors. *Trends in Microbiology* **11**:200-203.
244. **Yaku, H., and T. Mizuno.** 1997. The membrane-located osmosensory kinase, EnvZ, that contains a leucine zipper-like motif functions as a dimer in *Escherichia coli*. *Febs Letters* **417**:409-413.
245. **Yang, C., D. A. Rodionov, X. Q. Li, O. N. Laikova, M. S. Gelfand, O. P. Zagnitko, M. F. Romine, A. Y. Obraztsova, K. H. Nealson, and A. L. Osterman.** 2006. Comparative genomics and experimental characterization of N-acetylglucosamine utilization pathway of *Shewanella oneidensis*. *Journal of Biological Chemistry* **281**:29872-29885.
246. **Zachara, J. M., J. K. Fredrickson, S. M. Li, D. W. Kennedy, S. C. Smith, and P. L. Gassman.** 1998. Bacterial reduction of crystalline Fe³⁺ oxides in single phase suspensions and subsurface materials. *American Mineralogist* **83**:1426-1443.
247. **Zhang, W., and L. Shi.** 2005. Distribution and evolution of multiple-step phosphorelay in prokaryotes: lateral domain recruitment involved in the formation of hybrid-type histidine kinases. *Microbiology* **151**:2159-73.
248. **Zhang, Z., and W. A. Hendrickson.** 2010. Structural characterization of the predominant family of histidine kinase sensor domains. *J Mol Biol* **400**:335-53.
249. **Zhao, J. S., D. Manno, C. Beaulieu, L. Paquet, and J. Hawari.** 2005. *Shewanella sediminis* sp. nov., a novel Na⁺-requiring and hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-trinitro-degrading bacterium from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**:1511-1520.
250. **Zhao, J. S., D. Manno, C. Leggiadro, D. O'Neil, and J. Hawari.** 2006. *Shewanella halifaxensis* sp. nov., a novel obligately respiratory and denitrifying psychrophile. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**:205-12.
251. **Zhulin, I. B., A. N. Nikolskaya, and M. Y. Galperin.** 2003. Common extracellular sensory domains in transmembrane receptors for diverse signal transduction pathways in Bacteria and Archaea. *Journal of Bacteriology* **185**:285-294.
252. **Zhulin, I. B., B. L. Taylor, and R. Dixon.** 1997. PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem Sci* **22**:331-3.
253. **Ziegelhoffer, E. C., and T. J. Donohue.** 2009. Bacterial responses to photo-oxidative stress. *Nature Reviews Microbiology* **7**:856-863.

10 Danksagung

„Tatsächlich ist die Dankbarkeit eine Schuld, die gewöhnlich sogar anwächst, darin gleicht sie der Erpressung: je mehr man bezahlt, desto mehr wird gefordert.“

Mark Twain

Ungeachtet der Worte von Mark Twain möchte ich an dieser Stelle allen danken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. An erster Stelle danke ich Dr. Kai M. Thormann für die Bereitstellung des Themas und seine stete Bereitschaft zur Diskussion über den Fortgang meiner Arbeit.

Prof. Dr. Wolfgang Buckel danke ich dafür, ohne zu Zögern die Erstgutachterschaft meiner Arbeit übernommen zu haben.

Meinen Arbeitsgruppenkollegen möchte ich auch an dieser Stelle nochmals herzlich Danke sagen. Insbesondere Basti, Julia und Anja für drei tolle Jahre im Laboralltag, beim Kaffetrinken, beim Diskutieren, beim gemeinsamen Beisammensein auch außerhalb des Institutes und nicht zuletzt für ihre investierte Zeit und Mühe meine manchmal eindrucksvollen Satzbauteile zu entkomplizieren und die vielen Fehler meiner Rohfassung gnadenlos zu eliminieren.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die Bachelorarbeit von Anna-Lena Henche und die Masterarbeit von Lucas Binnenkade betreut. Ich weiß, gelegentlich bin ich als Betreuer nicht ganz einfach. Danke, dass Ihr euch trotz des von mir aufgebürdeten Arbeitspensums nicht habt entmutigen lassen, sondern stets mit guter Laune jeden Tag aufs Neue wundervolle Ergebnisse produziertet.

Für eine gute Zusammenarbeit bin ich der Abteilung Ökophysiologie zu Dank verpflichtet. Insbesondere danke ich Prof. Dr. Lotte Søgaard-Andersen und Dr. Penelope Higgs für fruchtbare Diskussionen, die mein Wissen im Bereich der Zwei-Komponenten-Signaltransduktion nachhaltig bereichert haben und mir viele neue Ideen für den Fortgang meiner Arbeit einbrachten.

Nicht vergessen werden sollen an dieser Stelle die Kollegen, die mir den Laboralltag auch in schwierigeren Situationen oft leichter gemacht haben - Danke Tobi, Susan, Andi, Dani, Meike!!!

Auch die guten Geister dieser Abteilung Steffi W., Steffi L., Petra und Elisabeth sollen hier nicht unerwähnt bleiben.

Nicht zu Letzt möchte ich Herrn Dr. Manfred Irmeler danken, für seinen schnellen Einsatz, wenn die Software nicht so wollte wie ich. Dank Ihm weiß ich jetzt auch, wie wichtig der Cori-Zyklus ist, warum man auf Vitamin D keinesfalls verzichten sollte, wie Brot braun wird, und warum ich als Biologe nichts in der Hans-Meerwein-Straße verloren habe.

Ich könnte an dieser Stelle die Liste der Personen, denen ich zu Dank verpflichtet bin, noch weiter fortsetzen, doch das tue ich nicht. Ihr Unerwähnten wisst ganz genau wofür ich euch dankbar bin, das brauche ich nicht extra niederzuschreiben!!!!

11 Anhänge

Anhang 1: Signifikant regulierte Gene in $\Delta arcS$ Mutanten unter aerobe Bedingungen

ORF	Gene	Regulation ¹	Product	COG description
SO_0003	<i>trmE</i>	-1.06	tRNA modification GTPase TrmE	General function prediction only
SO_0017	-	1.22	amidohydrolase	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport, Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SO_0020	<i>fadA</i>	1.45	3-ketoacyl-CoA thiolase	Lipid transport and metabolism
SO_0027	-	2.04	protoporphyrinogen oxidase, putative	Energy production and conversion, Coenzyme transport and metabolism
SO_0055	-	1.18	hypothetical protein	General function prediction only
SO_0075	-	-1.36	AMP-binding family protein	Lipid transport and metabolism
SO_0084	-	-1.16	HAD-superfamily hydrolase, subfamily 1A, variant 1 family protein	Energy production and conversion
SO_0086	-	-1.47	hypothetical protein	Function unknown
SO_0088	-	1.00	hypothetical protein	Function unknown
SO_0090	-	3.47	hypothetical protein	Function unknown
SO_0094	-	-1.07	hypothetical protein	Function unknown
SO_0095	<i>hutI</i>	-1.64	imidazolonepropionase	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SO_0120	-	-2.95	hypothetical protein	Function unknown
SO_0138	<i>moeA</i>	1.07	molybdopterin biosynthesis MoeA protein	Coenzyme transport and metabolism
SO_0151	-	-1.20	SAM-dependent methyltransferase	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism, General function prediction only
SO_0160	-	-1.04	transporter, putative	Coenzyme transport and metabolism
SO_0166	<i>gspD</i>	1.56	general secretion pathway protein D	Cell motility, Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
SO_0169	<i>gspG</i>	1.30	general secretion pathway protein G	Cell motility, Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
SO_0171	<i>gspI</i>	1.07	general secretion pathway protein I	Cell motility, Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
SO_0172	<i>gspJ</i>	1.70	general secretion pathway protein J	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
SO_0174	<i>gspL</i>	1.20	general secretion pathway protein L	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
SO_0182	-	1.10	hypothetical protein	Function unknown
SO_0184	-	1.44	microcystin dependent protein	Function unknown
SO_0185	-	1.17	microcystin dependent protein	Function unknown
SO_0186	-	1.17	microcystin dependent protein	Function unknown
SO_0187	-	1.31	serine protease	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_0188	-	1.16	hypothetical protein	Function unknown
SO_0189	-	1.27	fibronectin type III domain-containing protein	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SO_0206	<i>trmA</i>	-1.02	tRNA (uracil-5-)-methyltransferase	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SO_0216	-	-1.28	hypothetical protein	Function unknown
SO_0260	<i>ccmD</i>	1.01	heme exporter protein CcmD	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport

Anhang 1: Signifikant regulierte Gene in $\Delta arcS$ Mutanten unter aerobe Bedingungen

ORF	Gene	Regulation ¹	Product	COG description
SO_0261	<i>ccmC</i>	1.02	heme exporter protein CcmC	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_0262	<i>ccmB</i>	1.25	heme exporter protein CcmB	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_0263	<i>ccmA</i>	1.79	cytochrome c biogenesis protein CcmA	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_0264	<i>scyA</i>	-1.10	cytochrome c	Energy production and conversion
SO_0265	-	1.57	hypothetical protein	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_0266	<i>ccmF-1</i>	1.09	cytochrome c-type biogenesis protein CcmF	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_0312	-	-3.62	outer membrane porin, putative	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_0313	<i>potE</i>	-4.21	putrescine transporter	Amino acid transport and metabolism
SO_0314	<i>speF</i>	-4.35	ornithine decarboxylase	Amino acid transport and metabolism
SO_0322	-	1.08	hypothetical protein	Function unknown
SO_0324	-	2.16	hypothetical protein	Function unknown
SO_0325	-	1.18	dsrE-related protein	Inorganic ion transport and metabolism
SO_0326	-	1.83	hypothetical protein	Function unknown
SO_0334	-	2.36	hypothetical protein	Function unknown
SO_0335	-	-2.85	hypothetical protein	Function unknown
SO_0347	-	-1.10	acyltransferase family protein	Lipid transport and metabolism
SO_0354	-	-1.21	sodium/calcium exchanger	Inorganic ion transport and metabolism
SO_0365	-	-1.12	major facilitator superfamily permease	Carbohydrate transport and metabolism, Amino acid transport and metabolism, Inorganic ion transport and metabolism, General function prediction only
SO_0396	<i>frdC</i>	2.53	fumarate reductase cytochrome b-556 subunit	Energy production and conversion
SO_0397	<i>frdC</i>	1.10	fumarate reductase cytochrome B subunit	Function unknown
SO_0403	-	-3.63	hypothetical protein	Energy production and conversion
SO_0404	-	-6.22	hypothetical protein	Function unknown
SO_0468	<i>ubiA</i>	-1.09	4-hydroxybenzoate octaprenyltransferase	Coenzyme transport and metabolism
SO_0490	-	1.15	transcriptional regulator	Transcription
SO_0504	<i>fre</i>	-1.46	FMN reductase	Coenzyme transport and metabolism, Energy production and conversion
SO_0524	-	-1.77	HlyD family secretion protein	Defense mechanisms
SO_0552	-	2.00	hypothetical protein	Function unknown
SO_0553	-	1.58	hypothetical protein	Function unknown
SO_0556	-	-1.61	hypothetical protein	Function unknown
SO_0559	-	-1.13	MaoC domain-containing protein	Lipid transport and metabolism
SO_0562	-	-1.18	hypothetical protein	Function unknown

Anhang 1: Signifikant regulierte Gene in $\Delta arcS$ Mutanten unter aerobe Bedingungen

ORF	Gene	Regulation ¹	Product	COG description
SO_0563	-	-2.80	hypothetical protein	Function unknown
SO_0569	-	1.22	sensory box/GGDEF family protein	Signal transduction mechanisms
SO_0570	-	1.78	response regulator	Signal transduction mechanisms
SO_0575	<i>hepA</i>	-1.19	ATP-dependent helicase HepA	Transcription, Replication, recombination and repair
SO_0577	-	-1.85	sensory box histidine kinase/response regulator	Signal transduction mechanisms
SO_0581	-	3.09	hypothetical protein	Function unknown
SO_0582	<i>tpm</i>	1.40	thiopurine S-methyltransferase	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism, General function prediction only
SO_0583	<i>bfd</i>	-1.61	bacterioferritin-associated ferredoxin	Inorganic ion transport and metabolism
SO_0588	-	-1.12	transporter, putative	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_0595	-	1.53	hypothetical protein	General function prediction only
SO_0613	<i>pabA</i>	-1.09	para-aminobenzoate synthase glutamine amidotransferase, component II	Amino acid transport and metabolism, Coenzyme transport and metabolism
SO_0616	-	1.25	esterase, putative	Lipid transport and metabolism
SO_0620	-	1.11	hypothetical protein	Function unknown
SO_0639	-	1.75	collagenase family protein	Function unknown
SO_0671	-	1.32	hypothetical protein	Function unknown
SO_0672	-	1.22	hypothetical protein	Function unknown
SO_0696	<i>dipZ</i>	1.20	thiol:disulfide interchange protein precursor	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones, Energy production and conversion
SO_0697	<i>cutA</i>	1.57	periplasmic divalent cation tolerance protein CutA	Inorganic ion transport and metabolism
SO_0702	-	-1.36	MATE efflux family protein	Defense mechanisms
SO_0703	<i>groES</i>	1.07	co-chaperonin GroES	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_0704	<i>groEL</i>	1.01	chaperonin GroEL	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_0717	-	1.11	monoheme cytochrome c	Energy production and conversion
SO_0721	-	-2.20	hypothetical protein	Function unknown
SO_0752	-	-3.31	hypothetical protein	Function unknown
SO_0755	-	-1.47	hypothetical protein	Function unknown
SO_0761	<i>glnB-1</i>	-1.35	nitrogen regulatory protein P-II 1	Amino acid transport and metabolism
SO_0775	-	-1.63	hypothetical protein	Function unknown
SO_0785	-	-1.43	hypothetical protein	Function unknown
SO_0788	-	-1.51	hypothetical protein	Function unknown
SO_0797	-	1.10	hypothetical protein	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones, Energy production and conversion
SO_0798	-	1.83	hypothetical protein	Inorganic ion transport and metabolism, Coenzyme transport and metabolism

Anhang 1: Signifikant regulierte Gene in $\Delta arcS$ Mutanten unter aerobe Bedingungen

ORF	Gene	Regulation ¹	Product	COG description
SO_0806	-	1.86	alkaline phosphatase, putative	Inorganic ion transport and metabolism
SO_0839	-	-1.03	LysR family transcriptional regulator	Transcription
SO_0843	-	2.38	LysR family transcriptional regulator	Transcription
SO_0844	-	-1.90	hypothetical protein	Function unknown
SO_0848	<i>napA</i>	1.79	nitrate reductase	Energy production and conversion
SO_0849	<i>napD</i>	2.33	napD protein	Inorganic ion transport and metabolism
SO_0850	-	-1.59	hypothetical protein	Function unknown
SO_0852	-	-1.07	hypothetical protein	Function unknown
SO_0853	-	-1.30	pilin, putative	Cell motility, Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
SO_0858	-	-1.65	sodium:alanine symporter family protein	Amino acid transport and metabolism
SO_0863	-	-1.18	hypothetical protein	Function unknown
SO_0864	-	2.15	LuxR family transcriptional regulator	Signal transduction mechanisms, Transcription
SO_0865	-	5.02	hypothetical protein	Function unknown
SO_0866	-	6.39	minor curlin subunit CsgB, putative	Function unknown
SO_0867	-	3.47	serine protease	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones, General function prediction only
SO_0883	-	1.01	hypothetical protein	Function unknown
SO_0894	-	-1.37	hypothetical protein	Function unknown
SO_0900	-	1.14	aldo/keto reductase family oxidoreductase	Energy production and conversion
SO_0902	<i>nqrA-l</i>	2.97	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit A	Energy production and conversion
SO_0903	<i>nqrB-l</i>	1.21	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit B	Energy production and conversion
SO_0904	<i>nqrC-l</i>	1.93	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit C	Energy production and conversion
SO_0906	<i>nqrE-l</i>	1.36	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit E	Energy production and conversion
SO_0916	-	1.28	MarR family transcriptional regulator	Transcription, General function prediction only
SO_0918	<i>aac</i>	1.54	aculeacin A acylase	General function prediction only
SO_0919	-	-1.28	serine transporter, putative	Amino acid transport and metabolism
SO_0923	-	-1.28	hypothetical protein	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_0940	-	2.37	transcriptional regulator-related protein	Transcription
SO_0941	-	3.18	hypothetical protein	Function unknown
SO_0944	-	1.70	hypothetical protein	General function prediction only
SO_0945	-	3.80	AcrB/AcrD/AcrF family protein	Defense mechanisms
SO_0946	-	4.44	hypothetical protein	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_0956	<i>ahpF</i>	-1.09	alkyl hydroperoxide reductase, F subunit	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones

Anhang 1: Signifikant regulierte Gene in $\Delta arcS$ Mutanten unter aerobe Bedingungen

ORF	Gene	Regulation ¹	Product	COG description
SO_0961	-	-1.35	hypothetical protein	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_0970	-	1.15	fumarate reductase flavoprotein subunit precursor	Energy production and conversion
SO_0974	-	-1.51	hypothetical protein	Function unknown
SO_0994	-	2.14	hypothetical protein	Function unknown
SO_0999	<i>pbpG</i>	-1.07	D-alanyl-D-alanine endopeptidase	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_1064	-	1.21	hypothetical protein	General function prediction only
SO_1066	-	1.35	extracellular nuclease	General function prediction only
SO_1071	-	-1.91	hypothetical protein	Function unknown
SO_1074	-	-1.14	tyrosine-specific transport protein, putative	Amino acid transport and metabolism
SO_1075	-	1.19	hypothetical protein	Function unknown
SO_1087	-	-1.73	Na ⁺ /H ⁺ antiporter family protein	Energy production and conversion
SO_1091	-	-1.32	hypothetical protein	Carbohydrate transport and metabolism, Amino acid transport and metabolism, General function prediction only
SO_1092	-	-1.02	AraC/XylS family transcriptional regulator	Transcription
SO_1094	-	-1.80	putative transcription elongation factor	Transcription
SO_1102	-	1.16	TonB-dependent receptor domain-containing protein	Inorganic ion transport and metabolism
SO_1112	<i>bfr1</i>	-1.27	bacterioferritin subunit 1	Inorganic ion transport and metabolism
SO_1120	-	-1.03	xanthine/uracil permease family protein	General function prediction only
SO_1126	<i>dnaK</i>	1.35	chaperone protein DnaK	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_1128	-	-1.05	hypothetical protein	Function unknown
SO_1144	-	-1.25	methyl-accepting chemotaxis protein	Cell motility, Signal transduction mechanisms
SO_1155	-	-2.72	hypothetical protein	Function unknown
SO_1159	-	-1.24	hypothetical protein	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
SO_1167	<i>rodA</i>	-1.04	rod shape-determining protein RodA	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
SO_1190	-	1.11	hypothetical protein	Inorganic ion transport and metabolism
SO_1195	-	-2.16	hypothetical protein	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SO_1207	<i>rpsO</i>	-1.38	30S ribosomal protein S15	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SO_1218	<i>deoA</i>	1.20	thymidine phosphorylase	Nucleotide transport and metabolism
SO_1268	-	1.09	glutamine synthetase	Amino acid transport and metabolism
SO_1278	-	1.58	methyl-accepting chemotaxis protein	Cell motility, Signal transduction mechanisms
SO_1279	-	1.01	hypothetical protein	Function unknown
SO_1281	-	-1.18	hypothetical protein	Function unknown
SO_1297	<i>gspA</i>	1.15	general secretion pathway protein a	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport, Cell wall/membrane/envelope biogenesis

Anhang 1: Signifikant regulierte Gene in $\Delta arcS$ Mutanten unter aerobe Bedingungen

ORF	Gene	Regulation ¹	Product	COG description
SO_1317	-	1.01	hypothetical protein	Function unknown
SO_1325	<i>gluB</i>	1.30	glutamate synthase subunit alpha	Amino acid transport and metabolism
SO_1326	-	1.71	hypothetical protein	General function prediction only
SO_1329	-	-1.28	adenylate cyclase-related protein	Signal transduction mechanisms
SO_1343	<i>rseA</i>	1.39	sigma-E factor negative regulatory protein	Signal transduction mechanisms
SO_1369	-	-1.00	hypothetical protein	General function prediction only
SO_1370	-	-1.11	hypothetical protein	General function prediction only
SO_1383	-	-1.51	DEAD-box ATP dependent DNA helicase	Replication, recombination and repair, Transcription, Translation, ribosomal structure and biogenesis
SO_1390	-	-1.20	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_1407	-	1.18	mercuric transport periplasmic protein MerP, putative	Inorganic ion transport and metabolism
SO_1415	-	2.36	TetR family transcriptional regulator	Transcription
SO_1416	-	1.44	DNA-binding response regulator	Signal transduction mechanisms
SO_1417	-	1.01	sensor histidine kinase	Signal transduction mechanisms
SO_1443	-	-1.32	hypothetical protein	Function unknown
SO_1469	-	-1.12	Cro/CI family transcriptional regulator	Transcription
SO_1478	-	3.14	methylase, putative	Coenzyme transport and metabolism
SO_1479	-	2.84	hypothetical protein	Function unknown
SO_1480	-	1.31	GGDEF family protein	Signal transduction mechanisms
SO_1483	<i>aceB</i>	1.83	malate synthase	Energy production and conversion
SO_1484	<i>aceA</i>	1.84	isocitrate lyase	Energy production and conversion
SO_1506	-	-1.19	MATE efflux family protein	Defense mechanisms
SO_1507	-	-1.30	hypothetical protein	Function unknown
SO_1508	-	-1.08	hypothetical protein	Amino acid transport and metabolism
SO_1512	-	-1.37	hypothetical protein	Energy production and conversion
SO_1513	-	-1.73	hypothetical protein	Nucleotide transport and metabolism
SO_1543	-	-1.18	hypothetical protein	Function unknown
SO_1568	-	-2.90	hypothetical protein	Function unknown
SO_1572	-	-1.94	hypothetical protein	Function unknown
SO_1581	<i>phnA</i>	-1.36	phnA protein	Inorganic ion transport and metabolism
SO_1589	-	1.23	hypothetical protein	Function unknown
SO_1591	-	1.74	hypothetical protein	Function unknown
SO_1635	<i>dxr</i>	1.15	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	Lipid transport and metabolism

Anhang 1: Signifikant regulierte Gene in $\Delta arcS$ Mutanten unter aerobe Bedingungen

ORF	Gene	Regulation ¹	Product	COG description
SO_1643	<i>rnhB</i>	1.09	ribonuclease HII	Replication, recombination and repair
SO_1649	-	1.87	hypothetical protein	Function unknown
SO_1650	-	1.47	hypothetical protein	Function unknown
SO_1666	<i>phhA</i>	2.84	phenylalanine 4-monooxygenase	Amino acid transport and metabolism
SO_1667	<i>phhB</i>	2.55	pterin-4- α -carbinolamine dehydratase	Coenzyme transport and metabolism
SO_1673	-	2.10	outer membrane protein W	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_1678	<i>mmsA</i>	1.08	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	Energy production and conversion
SO_1698	-	2.43	hypothetical protein	Function unknown
SO_1700	-	3.05	hypothetical protein	Function unknown
SO_1701	-	3.26	hypothetical protein	Function unknown
SO_1708	<i>cat2</i>	1.02	4-hydroxybutyrate coenzyme A transferase	Energy production and conversion
SO_1710	-	1.15	hypothetical protein	Function unknown
SO_1751	-	1.06	hypothetical protein	Amino acid transport and metabolism
SO_1759	-	-1.07	hypothetical protein	Function unknown
SO_1769	-	-1.43	glutamate decarboxylase, putative	Amino acid transport and metabolism
SO_1770	-	1.66	glycerate kinase, putative	Carbohydrate transport and metabolism
SO_1775	-	-1.25	phage SPO1 DNA polymerase domain-containing protein	Replication, recombination and repair
SO_1796	<i>lon</i>	1.43	ATP-dependent protease La	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_1806	<i>pspF</i>	1.93	psp operon transcriptional activator	Transcription, Signal transduction mechanisms
SO_1812	<i>mdeA</i>	2.65	methionine gamma-lyase	Amino acid transport and metabolism
SO_1813	-	1.68	DNA-binding protein, putative	Replication, recombination and repair
SO_1821	-	-2.19	outer membrane porin, putative	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_1822	-	3.79	TonB-dependent receptor, putative	Inorganic ion transport and metabolism
SO_1835	-	-1.31	hypothetical protein	Function unknown
SO_1836	-	-1.40	hypothetical protein	Function unknown
SO_1844	-	1.31	extracellular nuclease, putative	General function prediction only
SO_1858	-	-4.16	hypothetical protein	Function unknown
SO_1863	-	-1.71	HU family DNA-binding protein	Replication, recombination and repair
SO_1881	-	1.16	HlyD family-like protein	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_1888	-	1.01	hypothetical protein	Function unknown
SO_1895	-	1.12	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein	Lipid transport and metabolism
SO_1901	<i>sugE</i>	-1.16	sugE protein	Inorganic ion transport and metabolism

Anhang 1: Signifikant regulierte Gene in $\Delta arcS$ Mutanten unter aerobe Bedingungen

ORF	Gene	Regulation ¹	Product	COG description
SO_1909	-	1.01	hypothetical protein	Function unknown
SO_1911	-	2.97	short chain dehydrogenase/reductase family oxidoreductase	Lipid transport and metabolism, Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism, General function prediction only
SO_1915	-	2.51	serine protease	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones, General function prediction only
SO_1921	-	-2.12	hypothetical protein	Function unknown
SO_1961	<i>maa</i>	-1.08	maltose O-acetyltransferase	General function prediction only
SO_1962	-	1.39	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	Amino acid transport and metabolism, General function prediction only
SO_1963	-	1.87	hypothetical protein	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SO_1964	-	1.16	hypothetical protein	Function unknown
SO_1985	-	-1.80	transcriptional activator, putative	Signal transduction mechanisms
SO_1986	-	-1.91	RNA polymerase sigma-70 factor	Transcription
SO_1987	-	-1.35	ATP-dependent protease La	General function prediction only
SO_2004	-	-1.92	TonB-dependent receptor domain-containing protein	Inorganic ion transport and metabolism
SO_2010	-	-1.67	hypothetical protein	Function unknown
SO_2011	-	-1.22	hypothetical protein	Function unknown
SO_2016	<i>htpG</i>	1.88	heat shock protein 90	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_2017	-	2.90	thioredoxin-like protein	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_2042	-	1.11	putative sulfite oxidase subunit YedY	General function prediction only
SO_2044	<i>gloA</i>	-1.39	lactoylglutathione lyase	Amino acid transport and metabolism
SO_2047	-	1.13	prolyl oligopeptidase family protein	Amino acid transport and metabolism
SO_2049	-	1.12	GGDEF family protein	Signal transduction mechanisms
SO_2065	<i>tyrP</i>	-1.20	tyrosine-specific transport protein	Amino acid transport and metabolism
SO_2083	-	1.61	methyl-accepting chemotaxis protein	Cell motility, Signal transduction mechanisms
SO_2090	<i>hypE</i>	1.33	hydrogenase expression/formation protein HypE	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_2091	<i>hypD</i>	3.30	hydrogenase expression/formation protein HypD	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_2092	<i>hypC</i>	2.38	hydrogenase assembly chaperone hypC/hupF	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_2093	<i>hypB</i>	2.37	hydrogenase accessory protein HypB	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones, Transcription
SO_2096	-	1.63	hydrogenase expression/formation protein	Energy production and conversion
SO_2097	<i>hydC</i>	1.50	quinone-reactive Ni/Fe hydrogenase, cytochrome b subunit	Energy production and conversion
SO_2098	<i>hyaB</i>	3.88	quinone-reactive Ni/Fe hydrogenase, large subunit	Energy production and conversion
SO_2099	<i>hoxK</i>	3.81	quinone-reactive Ni/Fe hydrogenase, small subunit precursor	Energy production and conversion
SO_2109	-	1.90	hypothetical protein	Function unknown

Anhang 1: Signifikant regulierte Gene in $\Delta arcS$ Mutanten unter aerobe Bedingungen

ORF	Gene	Regulation ¹	Product	COG description
SO_2110	-	1.47	hypothetical protein	Function unknown
SO_2111	-	-1.44	hypothetical protein	Function unknown
SO_2113	-	-1.23	hypothetical protein	Function unknown
SO_2114	-	-1.03	hypothetical protein	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_2123	-	1.30	methyl-accepting chemotaxis protein	Cell motility, Signal transduction mechanisms
SO_2167	-	1.14	hypothetical protein	Energy production and conversion
SO_2191	<i>metC</i>	-1.04	cystathionine beta-lyase	Amino acid transport and metabolism
SO_2192	-	-1.12	sensor histidine kinase	Signal transduction mechanisms
SO_2203	<i>dggA</i>	-1.18	diacylglycerol kinase	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_2215	-	-1.17	sun protein, putative	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SO_2216	-	1.34	sensory box protein	Signal transduction mechanisms
SO_2241	-	1.14	hypothetical protein	Function unknown
SO_2251	-	1.10	hypothetical protein	General function prediction only
SO_2253	-	-1.55	acylphosphatase	Energy production and conversion
SO_2260	<i>suhB</i>	-1.79	extragenic suppressor protein SuhB	Carbohydrate transport and metabolism
SO_2279	<i>ilvI</i>	1.11	acetolactate synthase 3 catalytic subunit	Amino acid transport and metabolism, Coenzyme transport and metabolism
SO_2354	-	-1.33	hypothetical protein	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
SO_2373	-	-1.16	inner membrane transport protein YdhC	Carbohydrate transport and metabolism, Amino acid transport and metabolism, Inorganic ion transport and metabolism, General function prediction only
SO_2389	<i>emrD</i>	-3.55	multidrug resistance protein D	Carbohydrate transport and metabolism, Amino acid transport and metabolism, Inorganic ion transport and metabolism, General function prediction only
SO_2394	<i>dacB</i>	1.23	penicillin-binding protein 4	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_2395	-	1.85	acyl-CoA dehydrogenase family protein	Lipid transport and metabolism
SO_2399	-	-1.04	hypothetical protein	Carbohydrate transport and metabolism
SO_2426	-	1.48	DNA-binding response regulator	Signal transduction mechanisms, Transcription
SO_2427	-	-4.79	TonB-dependent receptor, putative	Inorganic ion transport and metabolism
SO_2446	-	2.69	hypothetical protein	Function unknown
SO_2483	-	-2.38	aminotransferase AlaT	Amino acid transport and metabolism
SO_2490	-	1.04	DNA-binding transcriptional regulator HexR	Transcription
SO_2493	-	1.34	TetR family transcriptional regulator	Transcription
SO_2515	-	-1.02	hypothetical protein	Function unknown
SO_2516	-	-1.97	hypothetical protein	Function unknown
SO_2525	-	-1.11	ABC transporter, ATP-binding protein	General function prediction only

Anhang 1: Signifikant regulierte Gene in $\Delta arcS$ Mutanten unter aerobe Bedingungen

ORF	Gene	Regulation ¹	Product	COG description
SO_2530	<i>def</i>	-1.38	peptide deformylase	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SO_2566	<i>asmA</i>	1.51	asmA protein	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_2569	-	-2.21	hypothetical protein	Function unknown
SO_2570	-	1.71	putative lipoprotein	Function unknown
SO_2587	<i>hemB-l</i>	2.02	delta-aminolevulinic acid dehydratase	Coenzyme transport and metabolism
SO_2594	-	1.91	hypothetical protein	General function prediction only
SO_2595	-	3.88	BNR repeat-containing protein	General function prediction only
SO_2596	-	3.50	hypothetical protein	Function unknown
SO_2597	-	4.16	hypothetical protein	Function unknown
SO_2625	<i>infA</i>	-1.63	translation initiation factor IF-1	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SO_2628	<i>cspD</i>	2.81	stress response protein CspD	Transcription
SO_2647	-	-1.61	cytosolic long-chain acyl-CoA thioester hydrolase family protein	Lipid transport and metabolism
SO_2653	-	-2.33	Ner family transcriptional regulator	Transcription
SO_2654	-	-2.42	transposase, putative	Replication, recombination and repair
SO_2657	-	-1.79	hypothetical protein	Function unknown
SO_2658	-	-1.62	hypothetical protein	Function unknown
SO_2660	-	-1.75	hypothetical protein	Function unknown
SO_2661	-	-1.43	hypothetical protein	Function unknown
SO_2663	-	-1.69	hypothetical protein	Function unknown
SO_2665	-	-1.72	hypothetical protein	Function unknown
SO_2682	-	-1.10	hypothetical protein	Function unknown
SO_2683	-	-1.27	hypothetical protein	Function unknown
SO_2711	-	1.59	hypothetical protein	Function unknown
SO_2727	-	-1.17	cytochrome c3	Replication, recombination and repair, Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_2745	<i>grxA</i>	-1.88	glutaredoxin 1	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_2751	-	1.00	MotA/TolQ/ExbB proton channel family protein	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
SO_2755	<i>rnt</i>	-1.38	ribonuclease T	Replication, recombination and repair
SO_2797	-	-2.64	hypothetical protein	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_2801	<i>lpxK</i>	-1.10	tetraacyldisaccharide 4'-kinase	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_2849	-	-1.37	acetyltransferase	Transcription, General function prediction only
SO_2850	-	-1.02	acetyltransferase	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SO_2856	-	1.41	CBS domain-containing protein	Signal transduction mechanisms

Anhang 1: Signifikant regulierte Gene in $\Delta arcS$ Mutanten unter aerobe Bedingungen

ORF	Gene	Regulation ¹	Product	COG description
SO_2857	-	1.86	sodium/solute symporter family protein	General function prediction only
SO_2858	-	1.45	hypothetical protein	Function unknown
SO_2861	-	-1.03	hypothetical protein	Cell wall/membrane/envelope biogenesis, Carbohydrate transport and metabolism
SO_2863	-	-1.07	hypothetical protein	Function unknown
SO_2865	-	-1.56	L-lysine exporter, putative	General function prediction only
SO_2868	-	-1.36	hypothetical protein	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_2888	-	1.50	hypothetical protein	Function unknown
SO_2889	-	1.12	sensory box histidine kinase	Signal transduction mechanisms, Cell motility
SO_2905	-	1.09	O-methyltransferase, putative	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism, General function prediction only
SO_2913	<i>pflA</i>	1.84	pyruvate formate lyase-activating enzyme 1	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_2918	-	-1.98	hypothetical protein	Function unknown
SO_2923	<i>gltS</i>	-1.20	sodium/glutamate symporter	Amino acid transport and metabolism
SO_2924	-	1.43	signal peptidase I family protein	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
SO_2926	-	1.69	ABC transporter, permease, putative	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SO_2927	-	2.92	ABC transporter, ATP-binding protein	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SO_2934	-	3.71	hypothetical protein	General function prediction only
SO_2945	-	2.15	hypothetical protein	Function unknown
SO_2954	-	1.87	hypothetical protein	Function unknown
SO_2955	-	1.64	hypothetical protein	Function unknown
SO_2960	-	1.16	hypothetical protein	Function unknown
SO_2962	-	1.20	hypothetical protein	Function unknown
SO_2963	-	1.19	prophage LambdaSo, HK97 family major capsid protein	Function unknown
SO_2964	-	1.28	ClpP protease family protein	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones, Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
SO_2968	-	1.05	phage terminase small subunit	Replication, recombination and repair
SO_2974	-	1.84	hypothetical protein	Function unknown
SO_2977	-	-1.67	hypothetical protein	Function unknown
SO_2988	-	-1.30	hypothetical protein	Function unknown
SO_2999	-	-1.06	hypothetical protein	Function unknown
SO_3029	-	-1.11	hypothetical protein	Function unknown
SO_3030	<i>alcA</i>	3.38	siderophore biosynthesis protein	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SO_3031	-	1.34	siderophore biosynthesis protein, putative	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SO_3032	-	1.18	siderophore biosynthesis protein, putative	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism

Anhang 1: Signifikant regulierte Gene in $\Delta arcS$ Mutanten unter aerobe Bedingungen

ORF	Gene	Regulation ¹	Product	COG description
SO_3033	-	1.40	ferric alcaligin siderophore receptor	Inorganic ion transport and metabolism
SO_3047	-	1.18	hypothetical protein	Function unknown
SO_3048	-	1.24	isoquinoline 1-oxidoreductase, beta subunit, putative	Energy production and conversion
SO_3051	-	1.01	xanthine dehydrogenase accessory factor	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_3053	-	1.37	hypothetical protein	Function unknown
SO_3054	-	1.35	metallo-beta-lactamase family protein	General function prediction only
SO_3059	-	1.91	formate hydrogenlyase transcriptional activator, putative	Transcription, Signal transduction mechanisms
SO_3060	-	-1.19	outer membrane porin, putative	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_3063	-	1.29	sodium:alanine symporter family protein	Amino acid transport and metabolism
SO_3090	-	1.69	MoxR domain-containing protein	General function prediction only
SO_3091	-	1.85	hypothetical protein	General function prediction only
SO_3092	-	1.45	hypothetical protein	Function unknown
SO_3093	-	1.36	von Willebrand factor type A domain-containing protein	General function prediction only
SO_3094	-	1.60	TPR domain-containing protein	General function prediction only
SO_3095	-	1.07	hypothetical protein	Function unknown
SO_3099	-	-6.40	long-chain fatty acid transport protein, putative	Lipid transport and metabolism
SO_3101	-	1.13	hypothetical protein	Function unknown
SO_3102	-	1.07	AcrA/AcrE family protein	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_3106	<i>aprE</i>	4.16	cold-active serine alkaline protease	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_3122	-	-1.47	serine/threonine transporter SstT	Amino acid transport and metabolism
SO_3132	-	-2.77	hypothetical protein	Function unknown
SO_3135	-	-1.33	C4-dicarboxylate transporter, putative	Carbohydrate transport and metabolism
SO_3136	<i>dctM</i>	-1.24	C4-dicarboxylate transport protein	Carbohydrate transport and metabolism
SO_3145	<i>etfB</i>	1.33	electron transfer flavoprotein, beta subunit	Energy production and conversion
SO_3161	-	-1.15	glucose-1-phosphate thymidyltransferase-related protein	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_3275	-	-1.92	hypothetical protein	Function unknown
SO_3279	-	1.80	AcrB/AcrD/AcrF family protein	Defense mechanisms
SO_3301	-	-1.23	flavocytochrome c flavin subunit	Energy production and conversion
SO_3305	-	-1.86	LuxR family DNA-binding response regulator	Signal transduction mechanisms, Transcription
SO_3342	-	-1.71	hypothetical protein	Function unknown
SO_3350	<i>pilU</i>	1.79	twitching motility protein PilU	Cell motility, Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
SO_3351	<i>pilT</i>	1.79	twitching motility protein PilT	Cell motility, Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport

Anhang 1: Signifikant regulierte Gene in $\Delta arcS$ Mutanten unter aerobe Bedingungen

ORF	Gene	Regulation ¹	Product	COG description
SO_3377	-	-1.22	hypothetical protein	Function unknown
SO_3378	-	-1.22	hypothetical protein	Function unknown
SO_3380	-	-1.24	hypothetical protein	Function unknown
SO_3381	-	-1.34	hypothetical protein	General function prediction only
SO_3382	-	-1.69	short chain dehydrogenase/reductase family oxidoreductase	Lipid transport and metabolism, Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism, General function prediction only
SO_3383	-	-1.74	transcriptional regulator-related protein	Function unknown
SO_3386	-	-1.05	hypothetical protein	Function unknown
SO_3395	-	2.61	hypothetical protein	Function unknown
SO_3403	<i>yfiA-1</i>	1.41	ribosomal subunit interface protein	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SO_3404	-	1.23	methyl-accepting chemotaxis protein	Cell motility, Signal transduction mechanisms
SO_3408	-	1.11	hypothetical protein	Function unknown
SO_3418	-	-1.07	hypothetical protein	Function unknown
SO_3422	<i>yfiA-2</i>	2.20	ribosomal subunit interface protein	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SO_3432	<i>rpoS</i>	2.02	RNA polymerase sigma-38 factor	Transcription
SO_3433	<i>nlpD</i>	2.26	lipoprotein NlpD	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_3469	<i>ribD</i>	1.05	riboflavin biosynthesis protein RibD	Coenzyme transport and metabolism
SO_3480	-	1.20	phosphatase	Signal transduction mechanisms
SO_3489	-	3.06	GGDEF domain-containing protein	Signal transduction mechanisms
SO_3507	-	1.08	hypothetical protein	Carbohydrate transport and metabolism
SO_3514	-	1.08	TonB-dependent receptor	Inorganic ion transport and metabolism
SO_3527	-	1.05	hypothetical protein	Cell motility, Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
SO_3537	<i>rpsT</i>	-1.75	30S ribosomal protein S20	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SO_3538	<i>hlyU</i>	1.25	transcriptional regulator HlyU	Transcription
SO_3540	-	-1.16	hypothetical protein	Function unknown
SO_3542	-	1.44	putative phosphoketolase	Carbohydrate transport and metabolism
SO_3558	-	1.32	hypothetical protein	Function unknown
SO_3559	<i>gshA</i>	1.33	glutamate--cysteine ligase	Coenzyme transport and metabolism
SO_3560	-	2.53	M16 family peptidase	General function prediction only
SO_3562	-	-1.56	proton/glutamate symporter, putative	Energy production and conversion
SO_3573	-	-1.52	hypothetical protein	Function unknown
SO_3577	<i>clpB</i>	1.08	clpB protein	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones

Anhang 1: Signifikant regulierte Gene in *ΔarcS* Mutanten unter aerobe Bedingungen

ORF	Gene	Regulation ¹	Product	COG description
SO_3582	-	-1.33	methyl-accepting chemotaxis protein	Cell motility, Signal transduction mechanisms
SO_3611	-	1.24	AAA family ATPase	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_3627	-	1.65	TetR family transcriptional regulator	Transcription
SO_3638	<i>pdxA</i>	1.02	pyridoxal phosphate biosynthetic protein PdxA	Coenzyme transport and metabolism
SO_3656	-	-1.43	hypothetical protein	Function unknown
SO_3657	-	-1.25	amino acid transporter LysE	Amino acid transport and metabolism
SO_3668	-	1.27	hypothetical protein	Inorganic ion transport and metabolism
SO_3679	-	1.05	hypothetical protein	Function unknown
SO_3685	-	2.13	curli production assembly/transport component CsgG, putative	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_3686	-	1.57	curli production assembly/transport component CsgF, putative	Function unknown
SO_3687	-	3.42	curli production assembly/transport component CsgE, putative	Function unknown
SO_3688	-	1.26	nitrogen regulation protein NtrY, putative	Signal transduction mechanisms
SO_3689	-	1.30	sigma-54 dependent nitrogen response regulator	Signal transduction mechanisms
SO_3705	-	-2.68	5-methylthioadenosine nucleosidase/S-adenosylhomocysteine nucleosidase, putative	Nucleotide transport and metabolism
SO_3706	-	-3.53	NupC family protein	Nucleotide transport and metabolism
SO_3715	-	-1.00	dihydropteridine reductase	Energy production and conversion
SO_3720	-	1.55	hypothetical protein	Energy production and conversion, Coenzyme transport and metabolism
SO_3774	-	1.17	bifunctional proline dehydrogenase/pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	Amino acid transport and metabolism, Energy production and conversion
SO_3800	-	2.66	serine protease	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_3808	-	1.57	hypothetical protein	Function unknown
SO_3813	-	-1.22	hypothetical protein	Function unknown
SO_3840	-	-1.31	ECF subfamily RNA polymerase sigma factor	Transcription
SO_3847	-	-1.41	hypothetical protein	Function unknown
SO_3848	-	-1.20	hypothetical protein	Function unknown
SO_3857	-	-1.41	PAP2 family protein	Lipid transport and metabolism
SO_3864	<i>modB</i>	1.20	molybdate ABC transporter permease protein	Inorganic ion transport and metabolism
SO_3867	-	-1.53	Cro/C1 family transcriptional regulator	Transcription
SO_3877	-	-1.09	hypothetical protein	Function unknown
SO_3884	-	-1.45	phage integrase family site specific recombinase	Replication, recombination and repair
SO_3895	-	-1.08	HesA/MoeB/ThiF family protein	Coenzyme transport and metabolism
SO_3913	-	2.57	putative hydroxylase	Function unknown

Anhang 1: Signifikant regulierte Gene in $\Delta arcS$ Mutanten unter aerobe Bedingungen

ORF	Gene	Regulation ¹	Product	COG description
SO_3914	-	2.58	TonB-dependent receptor, putative	Inorganic ion transport and metabolism
SO_3915	-	1.39	hypothetical protein	Cell motility
SO_3942	-	1.68	serine protease	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_3967	-	-1.08	hypothetical protein	Inorganic ion transport and metabolism
SO_3969	-	-3.20	OmpA family protein	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_3980	<i>nrfA</i>	1.43	cytochrome c nitrite reductase	Inorganic ion transport and metabolism
SO_3983	-	-1.23	hypothetical protein	Function unknown
SO_3987	-	-1.00	hypothetical protein	Function unknown
SO_4012	-	-1.83	hypothetical protein	Function unknown
SO_4013	-	-2.49	hypothetical protein	Function unknown
SO_4014	-	-3.18	AcrB/AcrD/AcrF family protein	Defense mechanisms
SO_4015	-	-4.20	hypothetical protein	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_4051	-	-1.24	HlyD family secretion protein	Defense mechanisms
SO_4052	-	-1.31	MarR family transcriptional regulator	Transcription
SO_4054	<i>metF</i>	-1.02	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	Amino acid transport and metabolism
SO_4057	<i>metJ</i>	-1.26	transcriptional repressor protein MetJ	Transcription, Amino acid transport and metabolism
SO_4058	-	-1.27	hypothetical protein	General function prediction only
SO_4069	-	-1.20	hypothetical protein	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism, General function prediction only
SO_4139	-	-1.27	hypothetical protein	General function prediction only
SO_4145	-	3.19	hypothetical protein	Signal transduction mechanisms
SO_4147	-	1.59	ABC transporter, ATP-binding/permease protein	Defense mechanisms
SO_4148	-	1.78	HlyD family secretion protein	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_4149	-	3.18	RTX toxin, putative	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SO_4157	-	2.07	DNA-binding response regulator	Signal transduction mechanisms
SO_4159	-	-1.35	hypothetical protein	Function unknown
SO_4164	-	1.43	hypothetical protein	Function unknown
SO_4170	-	-1.06	C factor cell-cell signaling protein	Lipid transport and metabolism, Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism, General function prediction only
SO_4178	-	-1.58	hypothetical protein	Cell wall/membrane/envelope biogenesis, Defense mechanisms
SO_4179	-	-1.49	glycosyl transferase, group 2 family protein	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_4180	-	-1.44	hypothetical protein	Signal transduction mechanisms
SO_4186	-	-1.00	hypothetical protein	Function unknown

Anhang 1: Signifikant regulierte Gene in $\Delta arcS$ Mutanten unter aerobe Bedingungen

ORF	Gene	Regulation ¹	Product	COG description
SO_4209	-	-1.88	hypothetical protein	Replication, recombination and repair
SO_4210	-	-2.36	hypothetical protein	Replication, recombination and repair
SO_4232	-	-1.21	long-chain fatty acid transport protein	Lipid transport and metabolism
SO_4238	-	-1.17	TPR domain-containing protein	General function prediction only
SO_4245	<i>argA</i>	-1.08	N-acetylglutamate synthase	Amino acid transport and metabolism
SO_4252	-	1.96	prolyl oligopeptidase family protein	Amino acid transport and metabolism
SO_4254	<i>folE</i>	-1.24	GTP cyclohydrolase I	Coenzyme transport and metabolism
SO_4255	<i>pyrE</i>	-1.16	orotate phosphoribosyltransferase	Nucleotide transport and metabolism
SO_4264	<i>hsdS-2</i>	1.82	type I restriction-modification system, S subunit	Defense mechanisms
SO_4265	<i>hsdM-2</i>	1.51	type I restriction-modification system, M subunit	Defense mechanisms
SO_4266	-	1.32	hypothetical protein	Function unknown
SO_4285	-	-1.27	hypothetical protein	Function unknown
SO_4314	<i>hemD</i>	1.21	uroporphyrinogen-III synthase	Coenzyme transport and metabolism
SO_4320	<i>aggA</i>	1.13	agglutination protein	Cell wall/membrane/envelope biogenesis, Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
SO_4321	-	1.12	OmpA family protein	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_4335	-	-1.42	phosphatidylglycerophosphatase B, putative	Lipid transport and metabolism
SO_4340	-	-1.41	hypothetical protein	Function unknown
SO_4342	-	-1.07	hypothetical protein	Function unknown
SO_4343	-	-1.02	aminotransferase, class V	Amino acid transport and metabolism
SO_4356	-	-1.91	hypothetical protein	Function unknown
SO_4361	-	-1.12	hypothetical protein	Function unknown
SO_4412	-	-1.72	hypothetical protein	Function unknown
SO_4413	-	3.12	kynureninase	Amino acid transport and metabolism
SO_4414	-	2.67	hypothetical protein	Function unknown
SO_4418	-	-1.31	trypanothione synthetase domain-containing protein	Function unknown
SO_4419	-	-1.44	hypothetical protein	Amino acid transport and metabolism
SO_4420	-	-1.39	M24/M37 family peptidase	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_4425	-	-1.50	GGDEF family protein	Signal transduction mechanisms
SO_4457	-	1.48	GGDEF domain-containing protein	Signal transduction mechanisms
SO_4463	-	1.90	prolyl 4-hydroxylase alpha subunit	Function unknown
SO_4469	-	-1.38	alcohol dehydrogenase, iron-containing	Energy production and conversion
SO_4474	-	-1.69	hypothetical protein	Function unknown

Anhang 1: Signifikant regulierte Gene in $\Delta arcS$ Mutanten unter aerobe Bedingungen

ORF	Gene	Regulation ¹	Product	COG description
SO_4481	-	-1.10	hypothetical protein	Function unknown
SO_4498	-	-1.52	hypothetical protein	Amino acid transport and metabolism
SO_4505	-	1.19	hypothetical protein	Function unknown
SO_4515	-	-1.43	formate dehydrogenase, C subunit, putative	Energy production and conversion
SO_4520	-	1.34	coproporphyrinogen III oxidase	Coenzyme transport and metabolism
SO_4527	-	-1.03	integral membrane domain-containing protein	Carbohydrate transport and metabolism, Amino acid transport and metabolism, General function prediction only
SO_4544	-	-1.11	hypothetical protein	Function unknown
SO_4555	-	-1.02	drug resistance transporter, Bcr/CflA family protein	Carbohydrate transport and metabolism, Amino acid transport and metabolism, Inorganic ion transport and metabolism, General function prediction only
SO_4557	-	-3.72	methyl-accepting chemotaxis protein	Cell motility, Signal transduction mechanisms
SO_4561	-	-1.21	hypothetical protein	Function unknown
SO_4570	-	-1.25	hypothetical protein	Function unknown
SO_4577	-	-1.22	hypothetical protein	Signal transduction mechanisms
SO_4592	-	1.57	hypothetical protein	Function unknown
SO_4593	-	1.68	hypothetical protein	Function unknown
SO_4604	-	-1.10	hypothetical protein	Function unknown
SO_4623	-	1.94	DNA-binding response regulator	Signal transduction mechanisms, Transcription
SO_4628	-	1.74	sulfatase	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_4681	-	-1.65	glycosyl transferase, group 1 family protein	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_4700	-	3.55	hypothetical protein	Function unknown
SO_4705	-	1.51	transcriptional regulator, putative	Transcription
SO_4708	-	-1.34	hypothetical protein	Function unknown
SO_4718	-	1.78	sigma-54 dependent response regulator	Signal transduction mechanisms
SO_4727	-	-1.54	hypothetical protein	Coenzyme transport and metabolism
SO_4728	-	-1.64	hypothetical protein	Function unknown
SO_4729	-	-1.12	hypothetical protein	Function unknown
SO_4730	<i>hemN</i>	1.53	coproporphyrinogen III oxidase	Coenzyme transport and metabolism
SO_4743	-	1.39	TonB-dependent receptor, putative	Inorganic ion transport and metabolism
SO_A0006	-	1.70	ParA family protein	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
SO_A0012	<i>rulB</i>	-1.20	SOS mutagenesis protein RulB	Replication, recombination and repair
SO_A0013	<i>rulA</i>	-1.28	SOS mutagenesis protein RulA	Transcription, Signal transduction mechanisms
SO_A0023	<i>higA</i>	-1.47	plasmid maintenance system antidote protein HigA	General function prediction only

Anhang 1: Signifikant regulierte Gene in *ΔarcS* Mutanten unter aerobe Bedingungen

ORF	Gene	Regulation ¹	Product	COG description
SO_A0036	-	-1.22	HicB-related protein	Function unknown
SO_A0043	-	-1.17	hypothetical protein	Function unknown
SO_A0047	-	1.60	hypothetical protein	Function unknown
SO_A0049	-	1.74	toxin secretion ABC transporter, ATP-binding subunit/permease protein, putative	Defense mechanisms
SO_A0050	-	1.34	toxin secretion, membrane fusion protein	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_A0056	-	-1.19	hypothetical protein	Function unknown
SO_A0057	-	-1.91	hypothetical protein	Function unknown
SO_A0058	-	-1.82	hypothetical protein	Function unknown
SO_A0059	-	-1.28	hypothetical protein	Function unknown
SO_A0068	-	-1.95	hypothetical protein	Transcription
SO_A0070	-	-1.63	hypothetical protein	Amino acid transport and metabolism
SO_A0087	-	-1.36	hypothetical protein	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
SO_A0185	-	-1.02	transcriptional regulator	Transcription
SO_A0159	-	-1.29	multidrug efflux transporter	Inorganic ion transport and metabolism

Anhang 2: Signifikant regulierte Gene in Δ SO_4444 Mutanten

ORF	Gene	Regulation ¹	Product	COG description
SO_0047	-	-1.666	carboxyl-terminal protease, putative	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_0089	-	-1.299	hypothetical protein	Function unknown
SO_0101	<i>fdnG</i>	0.427	selenium-containing formate dehydrogenase, nitrate inducible, alpha subunit	Energy production and conversion
SO_0306	-	-1.113	hypothetical protein	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
SO_0443	<i>zntR</i>	-1.16	zinc-responsive transcriptional regulator	Transcription
SO_0444	-	-1.223	hypothetical protein	General function prediction only
SO_0500	-	-1.543	methyl-accepting chemotaxis protein	Cell motility, Signal transduction mechanisms
SO_0521	-	-1.222	hypothetical protein	General function prediction only
SO_0543	-	-1.424	hypothetical protein	Function unknown
SO_0576	-	-1.249	PhoH family protein	Signal transduction mechanisms
SO_0584	-	-1.71	methyl-accepting chemotaxis protein	Cell motility, Signal transduction mechanisms
SO_0699	-	-1.616	hypothetical protein	Function unknown
SO_0841	-	-1.107	GGDEF domain-containing protein	Signal transduction mechanisms
SO_0848	<i>napA</i>	-1.284	nitrate reductase	Energy production and conversion
SO_0849	<i>napD</i>	-1.665	napD protein	Inorganic ion transport and metabolism
SO_0866	-	1.317	minor curlin subunit CsgB, putative	Function unknown
SO_0921	-	-1.357	hypothetical protein	Function unknown
SO_0925	-	-1.518	GGDEF domain-containing protein	Signal transduction mechanisms
SO_0987	-	-1.115	methyl-accepting chemotaxis protein	Cell motility, Signal transduction mechanisms
SO_1056	-	-1.32	methyl-accepting chemotaxis protein	Cell motility, Signal transduction mechanisms
SO_1070	<i>katB</i>	-1.282	catalase	Inorganic ion transport and metabolism
SO_1259	-	-1.513	LysR family transcriptional regulator	Transcription
SO_1278	-	-1.002	methyl-accepting chemotaxis protein	Cell motility, Signal transduction mechanisms
SO_1307	<i>aqpZ</i>	-0.93	aquaporin Z	Carbohydrate transport and metabolism
SO_1549	<i>xni</i>	-1.134	exonuclease IX	Replication, recombination and repair
SO_1550	-	-1.215	hypothetical protein	General function prediction only
SO_1606	-	-1.415	metallo-beta-lactamase superfamily protein	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism

Anhang 2: Signifikant regulierte Gene in Δ SO_4444 Mutanten

ORF	Gene	Regulation ¹	Product	COG description
SO_1753	-	-1.742	hypothetical protein	General function prediction only
SO_1787	-	-1.153	hypothetical protein	Function unknown
SO_1830	-	-1.602	GGDEF domain-containing protein	Signal transduction mechanisms
SO_1973	-	-1.281	ABC transporter	Amino acid transport and metabolism, Signal transduction mechanisms
SO_2117	-	-1.044	methyl-accepting chemotaxis protein	Cell motility, Signal transduction mechanisms
SO_2121	<i>cheA</i>	-1.098	chemotaxis protein CheA	Cell motility, Signal transduction mechanisms
SO_2123	-	-1.211	methyl-accepting chemotaxis protein	Cell motility, Signal transduction mechanisms
SO_2127	-	-1.356	response regulator	Signal transduction mechanisms
SO_2144	-	-1.412	hypothetical protein	Energy production and conversion
SO_2228	-	-1.382	CBS domain-containing protein	General function prediction only
SO_2253	-	-1.105	acylphosphatase	Energy production and conversion
SO_2285	-	-1.156	hypothetical protein	Amino acid transport and metabolism
SO_2366	-	-1.257	response regulator	Transcription, Signal transduction mechanisms
SO_2440	<i>thiH</i>	1.669	thiamine biosynthesis protein ThiH	Coenzyme transport and metabolism, General function prediction only
SO_2441	<i>thiG</i>	1.557	thiazole synthase	Coenzyme transport and metabolism
SO_2442	<i>thiS</i>	1.442	thiS protein, putative	Coenzyme transport and metabolism
SO_2443	<i>thiF</i>	1.616	thiF protein, putative	Coenzyme transport and metabolism
SO_2444	<i>thiDE</i>	1.63	phosphomethylpyrimidine kinase/thiamin-phosphate pyrophosphorylase, putative	Coenzyme transport and metabolism
SO_2445	<i>thiC</i>	1.788	thiamine biosynthesis protein ThiC	Coenzyme transport and metabolism
SO_2540	-	-1.012	response regulator	Signal transduction mechanisms
SO_2715	-	1.179	TonB-dependent receptor	Inorganic ion transport and metabolism
SO_2737	<i>bioD</i>	0.416	dithiobiotin synthetase	Coenzyme transport and metabolism
SO_2738	<i>bioC</i>	1.192	biotin synthesis protein BioC	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism, General function prediction only
SO_2739	<i>bioF</i>	1.05	8-amino-7-oxononanoate synthase	Coenzyme transport and metabolism
SO_2795	-	-1.331	glyoxalase family protein	General function prediction only
SO_2807	-	-1.202	hypothetical protein	Function unknown
SO_2852	-	-1.444	GntR family transcriptional regulator	Transcription
SO_2882	-	-2.138	serine protein kinase	Signal transduction mechanisms

Anhang 2: Signifikant regulierte Gene in Δ SO_4444 Mutanten

ORF	Gene	Regulation ¹	Product	COG description
SO_2883	-	-1.711	hypothetical protein	Function unknown
SO_2884	-	-1.885	hypothetical protein	Function unknown
SO_2890	-	-1.451	hypothetical protein	Function unknown
SO_2995	-	-0.999	hypothetical protein	Function unknown
SO_3052	-	-1.259	methyl-accepting chemotaxis protein	Cell motility, Signal transduction mechanisms
SO_3100	-	-1.181	hypothetical protein	Amino acid transport and metabolism
SO_3121	-	-1.089	hypothetical protein	Function unknown
SO_3132	-	-1.485	hypothetical protein	Function unknown
SO_3252	<i>cheV-3</i>	-0.972	chemotaxis protein CheV	Signal transduction mechanisms, Cell motility
SO_3337	-	-1.19	hypothetical protein	Signal transduction mechanisms
SO_3402	-	-1.317	hypothetical protein	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
SO_3403	<i>yfiA-1</i>	-1.223	ribosomal subunit interface protein	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SO_3422	<i>yfiA-2</i>	-1.475	ribosomal subunit interface protein	Translation, ribosomal structure and biogenesis
SO_3432	<i>rpoS</i>	-1.234	RNA polymerase sigma-38 factor	Transcription
SO_3491	-	-1.338	HDIG domain-containing protein	Signal transduction mechanisms
SO_3497	-	-1.083	beta alanine--pyruvate transaminase	Coenzyme transport and metabolism
SO_3501	-	-1.195	hypothetical protein	General function prediction only
SO_3502	-	-1.709	hypothetical protein	Function unknown
SO_3542	-	-1.118	putative phosphoketolase	Carbohydrate transport and metabolism
SO_3582	-	-1.58	methyl-accepting chemotaxis protein	Cell motility, Signal transduction mechanisms
SO_3759	-	-1.165	GGDEF domain-containing protein	Signal transduction mechanisms
SO_3777	-	-1.146	hypothetical protein	Replication, recombination and repair
SO_3838	-	-1.187	methyl-accepting chemotaxis protein	Cell motility, Signal transduction mechanisms
SO_3890	-	-1.169	methyl-accepting chemotaxis protein	Cell motility, Signal transduction mechanisms, Inorganic ion transport and metabolism
SO_3894	-	-1.35	sensor histidine kinase	Signal transduction mechanisms
SO_4026	-	-1.428	hypothetical protein	Function unknown
SO_4149	-	-1.357	RTX toxin, putative	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism

Anhang 2: Signifikant regulierte Gene in Δ SO_4444 Mutanten

ORF	Gene	Regulation ¹	Product	COG description
SO_4186	-	-1.563	hypothetical protein	Function unknown
SO_4444	-	-2.186	capsular synthesis regulator component B, putative	Signal transduction mechanisms, Transcription
SO_4454	-	-1.07	methyl-accepting chemotaxis protein	Cell motility, Signal transduction mechanisms
SO_4508	-	-1.792	hypothetical protein	Function unknown
SO_4509	-	-1.384	formate dehydrogenase, alpha subunit	Energy production and conversion
SO_4511	-	-0.887	formate dehydrogenase, C subunit, putative	Energy production and conversion
SO_4563	-	-3.089	hypothetical protein	Signal transduction mechanisms
SO_4566	-	-1.361	hypothetical protein	Function unknown
SO_4600	-	-1.355	antigen, putative	General function prediction only
SO_4606	-	-1.189	cytochrome c oxidase, subunit II	Energy production and conversion
SO_4607	-	-1.122	cytochrome c oxidase, subunit I	Energy production and conversion
SO_4609	-	-1.362	cytochrome c oxidase subunit III	Energy production and conversion
SO_4612	-	-1.107	hypothetical protein	Function unknown
SO_4697	<i>gst</i>	-1.268	glutathione S-transferase	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
SO_4748	<i>atpG</i>	1.13	F0F1 ATP synthase subunit gamma	Energy production and conversion
SO_4751	<i>atpF</i>	1.264	F0F1 ATP synthase subunit B	Energy production and conversion
SO_A0001	<i>repA</i>	-3.478	replication protein RepA	Function unknown
SO_A0003	-	-4.531	type II restriction endonuclease, putative	Function unknown
SO_A0004	-	-2.688	type II DNA modification methyltransferase	Replication, recombination and repair, Defense mechanisms
SO_A0005	-	-2.33	hypothetical protein	Function unknown
SO_A0006	-	-3.497	ParA family protein	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
SO_A0007	-	-4.209	hypothetical protein	Function unknown
SO_A0008	-	-2.383	hypothetical protein	Function unknown
SO_A0009	-	-1.472	hypothetical protein	Function unknown
SO_A0010	-	-1.341	hypothetical protein	General function prediction only
SO_A0011	-	-1.748	hypothetical protein	Function unknown
SO_A0012	<i>rulB</i>	-2.63	SOS mutagenesis protein RulB	Replication, recombination and repair
SO_A0013	<i>ruIA</i>	-1.558	SOS mutagenesis protein RulA	Transcription, Signal transduction mechanisms

Anhang 2: Signifikant regulierte Gene in Δ SO_4444 Mutanten

ORF	Gene	Regulation ¹	Product	COG description
SO_A0019	-	-1.105	ISSod9, DNA-invertase	Replication, recombination and repair
SO_A0058	-	-1.077	hypothetical protein	Function unknown
SO_A0159	-	-0.98	multidrug efflux transporter	Inorganic ion transport and metabolism
SO_A0172	-	-6.466	resolvase family site-specific recombinase	Replication, recombination and repair
SO_A0173	-	-3.95	hypothetical protein	Function unknown